

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Klinische Studie über den Zusammenhang von  
Kariesindizes und dem Auftreten gegenüber  
antimikrobiellen Peptiden unterschiedlich empfindlichen  
kariespathogenen Bakterienstämmen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Eliette Goeke

aus Köln

**2016**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. dent. Karin Christine Huth
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Dipl. Ing. (FH) Bogna Stawarczyk, MSc Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Wolfgang Fischer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	20.04.2016



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Definition und Epidemiologie der Karies .....	6
1.2	Pathomechanismus der Karies .....	7
1.3	Ätiologie der Karies .....	8
1.3.1	Mikrobielle Zahnplaque .....	8
1.3.1.1	Entstehung der Zahnplaque.....	9
1.3.1.2	Organisation der Bakterien als Biofilm .....	9
1.3.1.3	Spezielle Mikrobiologie der Plaque.....	10
1.3.2	Einfluss des Speichels .....	12
1.3.2.1	Allgemeine Funktionen.....	12
1.3.2.2	Immunologische Funktionen.....	13
1.4	Antimikrobielle Peptide .....	14
1.4.1	Wirkungsweise.....	14
1.4.2	Einteilung der AMPs.....	15
1.4.2.1	Cathelicidine .....	15
1.4.2.2	Defensine .....	17
1.4.3	Effekte von AMPs auf oralpathogene Bakterien .....	19
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Studienziel.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methode .....</b>	<b>22</b>
3.1	Patientenkollektiv.....	23
3.2	Anamneseerhebung und Befundung .....	24
3.3	Probenentnahme .....	25
3.4	Kultivierung und Isolierung der Bakterien .....	27
3.5	Quantifizierung der Bakterienlast .....	29
3.6	Speziesbestimmung der Bakterien .....	30
3.6.1	Prinzip der Keimbestimmung mittels MALDI-TOF MS.....	30
3.6.2	Verfahren der MALDI-TOF MS.....	31
3.7	Stammerhaltung der Zielkeime .....	33
3.8	DNA-Extraktion.....	33
3.9	Messung des DNA-Gehalts.....	34

3.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.11	Anzucht der Biofilme.....	39
3.12	Sensibilitätstestung der Biofilme .....	40
3.12.1	alamarBlue®-Assay .....	41
3.13	Risikostratifizierung der Bakterienstämme und Patienten.....	42
3.14	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
3.15	Bestimmung der AMP-Konzentrationen .....	44
3.16	Statistische Auswertung.....	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1	Deskriptive Ergebnisse der klinischen Untersuchung.....	48
4.1.1	Ernährungsgewohnheiten.....	49
4.1.2	Mundhygienemaßnahmen des Patienten.....	50
4.1.3	Vergangene Zahnarzterfahrung.....	52
4.1.4	Parodontaler Zustand und aktuelle Mundhygiene.....	54
4.1.5	Kariesbefundung .....	55
4.1.6	Speichelparameter .....	56
4.2	Korrelationen der erhobenen Parameter.....	59
4.3	AMP-Konzentrationen im Speichel .....	60
4.4	Mikrobiologische Auswertung.....	61
4.4.1	Speziesbestimmung und Stammgenotypisierung.....	61
4.4.2	Bestimmung der Keimzahlen.....	61
4.4.3	Korrelationsanalysen zwischen den einzelnen Parametern .....	62
4.4.4	Sensibilitätsprüfung der Bakterienstämme gegenüber AMPs.....	63
4.4.5	Risikostratifizierung der Bakterienstämme.....	66
4.4.6	Mikrobiologische Risikostratifizierung der Patienten .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>89</b>

<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>92</b>
	<b>Anhang 1 (Patientenaufklärung).....</b>	<b>93</b>
	<b>Anhang 2 (Anamnese- und Befundbogen) .....</b>	<b>95</b>
	<b>Anhang 3 (Votum der Ethikkommission).....</b>	<b>99</b>
	<b>Anhang 4 (Rezepte und Versuchsansätze) .....</b>	<b>100</b>

# 1            **Einleitung**

Auch in der heutigen Zeit liegt trotz verbesserter Präventions- und Therapiemöglichkeiten immer noch eine hohe Prävalenz von Karieserkrankungen in der Bevölkerung vor (Micheelis und Schiffner, 2006). Daher ist es, auch im Hinblick auf die Ökonomie des Gesundheitssystems von großer Wichtigkeit, dass eine Behandlung dieser Krankheit am individuellen Bedarf eines Patienten orientiert ist. Dazu müssen allerdings funktionierende diagnostische Schemata vorhanden sein, die eine Risikostratifizierung des Patienten ermöglichen (König, 1992). Ein vielversprechender Anhaltspunkt in dieser Hinsicht sind die Wirkungen und Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Dies sind kleine, endogene, zumeist kationische Peptide, die eine antimikrobielle Wirkung gegenüber einer Vielzahl von pathogenen Mikroorganismen zeigen. Die Wirkung dieser Peptide scheint nicht bei allen Bakterien und Patienten identisch zu sein und bietet möglicherweise einen Ansatzpunkt zur Beurteilung eines individuellen Kariesrisikos (Phattarataratip *et al.*, 2011). Diese Studie soll untersuchen, inwieweit Unterschiede in der Empfindlichkeit von kariespathogenen Bakterien gegenüber AMPs eine Aussage über das individuelle Kariesrisiko ermöglichen.

## 1.1            **Definition und Epidemiologie der Karies**

Als Karies bezeichnet man eine Infektionskrankheit, die durch die Einwirkung von Säuren über einen längeren Zeitraum zu fortschreitender Demineralisation der Zahnhartsubstanzen und schließlich zu ihrem Verlust führt (Bibby und Mundorff, 1975). Die entscheidende Rolle für diesen Prozess spielen hierbei saure Stoffwechselprodukte von oralen Bakterien in der Plaque (Orland *et al.*, 1955; Keyes, 1962).

Trotz eines zu erkennenden Rückgangs der Kariesprävalenz um 38,5% seit 1999 bei den 35- bis 44-jährigen, zeigte diese Gruppe im Jahr 2005 einen durchschnittlichen DMFT-Wert von 14,4 (Micheelis und Schiffner, 2006). Das bedeutet, dass über die Hälfte der Zähne der Patienten einen Kariesbefall zeigen oder in der Vergangenheit davon betroffen waren. Ebenso verdeutlicht eine aktuelle Veröffentlichung, deren Auswertung ebenso auf diese Studie zurückgreift, einen Trend zu immer mehr

restaurativ behandelten Zähnen (Schützhold *et al.*, 2013). Zwar ist ein Rückgang der kariös bedingten Zahnverluste zu erkennen was die Entwicklung zu immer mehr restaurativ behandelten Zähnen nochmals unterlegt. Besonders auffällig ist jedoch, dass in der Gruppe der 65- bis 74- jährigen die Prävalenz der Wurzelkaries deutlich angestiegen ist (+14%). Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass auch in der Gruppe der Senioren ein immer geringerer Zahnverlust zu beobachten ist (Micheelis, 2011).

## **1.2 Pathomechanismus der Karies**

Der entscheidende Faktor bei der Entstehung von Karies ist eine längere Expositionszeit der Zahnhartsubstanzen in einem sauren Milieu (Marsh und Nyvad, 2008). Bei länger bestehendem niedrigen pH-Wert an der Schmelzoberfläche kommt es zu einer initialen Entkalkung des Zahnschmelzes. In diesem Stadium, wo die Läsion noch auf den Schmelz begrenzt bleibt, ist eine Remineralisation der Zahnhartsubstanzen noch möglich (Lee *et al.*, 2010).

Bei länger bestehender Erkrankung schreitet die Entkalkung im Schmelz bis zum Dentin fort. Hat die Ausbreitung der Läsion die Schmelz-Dentin-Grenze erreicht, kommt es zu einem raschen unterminierenden Fortschreiten des kariösen Defekts im Dentin (Pilz, 1980). Dieser schnellere Verlauf wird bedingt durch dort vorhandenes, weiches organisches Material, wie Kollagen sowie die Tubulstruktur des Dentins bedingt (Schröder, 1991). Erfolgt auch in diesem Stadium keine zahnmedizinische Intervention, kommt es zu einer fortschreitenden, irreversiblen Destruktion der Dentinmatrix durch Freisetzung von proteolytischen Enzymen (z.B. Kollagenasen), beispielsweise durch *Streptococcus mutans* (Jackson *et al.*, 1997). Erreicht der Defekt die Zahnpulpa, führt die bakterielle Besiedelung zu einer Entzündung der pulpalen Gewebe (Pulpitis), was binnen kurzer Zeit zu irreversibler Gewebszerstörung führt (Reeves und Stanley, 1966). In der Folge kann sich die Infektion nach apikal ausbreiten (Parodontitis apicalis) (Hellwig *et al.*, 2009). Eine nun nötige Wurzelkanalbehandlung schwächt den Zahn durch Substanzverlust hinsichtlich seiner Stabilität deutlich, jedoch kann so eine Extraktion in vielen Fällen umgangen werden (Sedgley und Messer, 1992).

## **1.3 Ätiologie der Karies**

Generell ist Karies als eine chronische Infektionskrankheit zu betrachten (Takahashi und Nyvad, 2008). Karies ist, wie viele Erkrankungen der Mundhöhle, ein multifaktorielles Geschehen (Ellwood *et al.*, 1974). Durch eine Verschiebung des Keimspektrums in der Zahnplaque, zugunsten von kariespathogenen Mikroorganismen sinkt der pH-Wert in der Mundhöhle. Besteht dieser Zustand über einen längeren Zeitraum mit stetiger Zufuhr von niedrigmolekularen Kohlenhydraten tritt Karies als Folgeerscheinung auf (Kneist *et al.*, 2012). Weitere Kofaktoren sind unter anderem die Zusammensetzung des Speichels, die Abwehrlage des Organismus sowie die individuelle Oberflächenbeschaffenheit der Zahnhartsubstanzen (König, 1974; Larmas, 1985).

### **1.3.1 Mikrobielle Zahnplaque**

Als Anfangspunkt der Kariesentstehung muss die Etablierung von bakteriellem Zahnbelag („Zahnplaque“) gesehen werden (Rateitschak *et al.*, 1998). Ausgangspunkt für die Plaqueentstehung ist die Pellikel. Diese wird selbst bei gründlichster Zahnreinigung niemals komplett entfernt. Die Pellikel besteht überwiegend aus einer Schicht saurer, Prolin-reicher und phosphathaltiger Proteine, Glykoproteine (besonders Muzine) und Lipiden (Riethe, 1994).

Die Entstehung einer reifen Plaque ist ein wichtiger ätiologischer Faktor der Kariesentwicklung. Es zeigt sich insbesondere an den Kariesprädispositionsstellen eine vermehrte Plaqueanlagerung (Zuhrt *et al.*, 1971). Diese länger andauernde Bedeckung der Zahnschmelzen mit Plaque ist für die Kariesentstehung von grundlegender Bedeutung: So führt eine Besiedelung mit Laktat produzierenden Keimen zu einem deutlichen Abfall des pH-Wertes in der Plaque. Schutzsysteme zur Remineralisation von Schmelz, wie z.B. das Bikarbonatpuffersystem, können damit ihre Wirkung der Säurepufferung am Ort des Geschehens nicht entfalten (Tatevossian und Newbrun, 1983).

Dies führt zu einer fortschreitenden Entkalkung des Zahnschmelzes mit Herauslösen von Hydroxylapatitkristallen (Silverstone, 1981).

### **1.3.1.1 Entstehung der Zahnplaque**

Die Pellikel und deren mikrobielle Besiedelung ist der Ausgangspunkt für die Entstehung von Plaque (Sönju, 1986).

Die Plaqueentstehung kann in folgende Phasen eingeteilt werden: Inokulation/Übertragung von Mikroorganismen, Etablierung der Primärflora, Ausbildung einer Folgeflora und anschließende Ausdifferenzierung (Marsh und Martin, 1999).

Die initial unbesiedelte Pellikel wird binnen weniger Minuten durch den Speichel kontaminiert, was zu einer Kolonisation von Bakterien führt (Lie, 1975). Über 600 unterschiedliche Bakterienspezies wurden in der Mundhöhle gefunden, wobei sich bei einem einzelnen Individuums ca. 100 oder mehr unterschiedliche Spezies gleichzeitig in der Mundhöhle befinden (Dewhirst *et al.*, 2010). Hierbei handelt es sich vor allem initial um Aktinomyzeten, insbesondere *Actinomyces naeslundii* und *Actinomyces viscosus* (Björn und Carlsson, 1964). Bereits nach vier Stunden kommen immer häufiger miteinander eng verwandte Streptokokkenarten vor, welche in mehreren Schichten wachsen (Nyvad und Kilian, 1987). Vor allem sind hier *Strep. mutans*, *Strep. salivarius* und *Strep. sanguis* anzutreffen. Es treten an Zahnkronen und im Fissurenrelief in weiteren Stadien Laktobazillen (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) zur Flora hinzu (Theilade und Theilade, 1985). Durch die konstante Zufuhr von Nährstoffen und einem idealen, feuchten und warmen Milieu entsteht eine dreidimensionale vernetzte Struktur, bestehend aus den genannten Mikroorganismen, extrazellulären Polysacchariden und Proteinbestandteilen des Speichels (Maiwald, 1995).

### **1.3.1.2 Organisation der Bakterien als Biofilm**

Die mikrobiologische Organisationsform des Biofilms zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass Bakterien bis hin zu 500 verschiedenen Spezies in einem festen Verbund zusammen mit extrazellulären Substanzen existieren (Whittaker *et al.*, 1996, Marsh, 2004). Es ist seit längerem bekannt, dass Bakterien im Biofilm aufgrund ihrer Anordnung und Organisation im Gegensatz zu mobilen, planktonischen Zellen generell eine höhere Resistenz gegenüber Therapiemaßnahmen aufweisen (Mah und O'Toole, 2001). Es hat sich dabei im Vergleich eine 10–1000-fach größere Resistenz

von Mikroorganismen im Biofilm gezeigt (Evans und Holmes, 1987; Huth *et al.*, 2011). Insbesondere im Bereich der nosokomialen Infektionen hat sich herausgestellt, dass verschiedene biofilmbildende Bakterien für bis zu 65% der Infektionen verantwortlich sind (Archibald und Gaynes, 1997). Diese Zahl ist auch volkswirtschaftlich insbesondere für die gesetzlichen Krankenkassen ein enormer Kostenfaktor und damit von größter Relevanz (Licking, 1999).

Exopolysaccharide, welche von Bakterien sezerniert werden, bilden einen Grundbestandteil der Biofilmmatrix. Die Barriere des festen Verbundes aus Bakterien und extrazellulären Substanzen verhindert einen direkten Kontakt und somit die Wirkung von antimikrobiell wirksamen Substanzen (Steward, 1996; Gristina *et al.*, 1987). Ein weiterer Faktor für die erhöhte Resistenz scheint das Vorhandensein von einigen wenigen Bakterien eines besonders unempfindlichen Phänotyps zu sein. Diese sind beispielsweise in der Lage Antibiotika gezielt zu inaktivieren (Giwerzman *et al.*, 1991). Studien belegen, dass die meisten Bakterien innerhalb eines Biofilms durch Antibiotika abgetötet werden können, jedoch überleben stets einige wenige. Diese tragen zu einem Fortbestehen der Infektion bei (Goto *et al.*, 1999).

Die Zahnplaque stellt eine besondere Formation des Biofilms dar, bei welchem einige Besonderheiten hinzukommen. Insbesondere die Gattung *Actinomyces spp.* zeigt die Fähigkeit über Adhäsine einen festen Verbund mit der Zahnhartsubstanz einzugehen (Takahashi und Nyvad, 2008). Ein ähnliches Verhalten wurde für Bakterien der Gattung *Lactobacillus spp.* beschrieben (Haukioja *et al.*, 2006).

### **1.3.1.3 Spezielle Mikrobiologie der Plaque**

Hinsichtlich der Entstehung von Karies haben sich verschiedene Spezies als besonders pathogen erwiesen, insbesondere die Spezies *Strep. mutans*, aus der Gattung der Gram-positiven Streptokokken (Loesche, 1986). Als Stoffwechselprodukt des Energiestoffwechsels von *Strep. mutans* sind vor allem einfache organische Säuren, wie z.B. Milchsäure bzw. deren Anion Laktat zu nennen. Einerseits führen diese Stoffwechselprodukte zu einem Sinken des pH-Werts im Zahnbelag, wobei zwischen Werten von 5 und 5,5 ein kritischer Punkt für die Säurestabilität von Hydroxylapatit erreicht wird (Kneist *et al.*, 2012). Andererseits liegen genau in diesem Bereich



optimale Lebensbedingungen für *Strep. mutans* vor (Harper *et al.*, 1983). Zusätzlich ist *Strep. mutans* in der Lage, aus Mono- und Disacchariden größere Polysaccharide zu synthetisieren. Das so entstehende Netz aus unterschiedlichen Polysacchariden ist maßgeblich an der Plaqueentstehung beteiligt, was unter anderem dadurch verdeutlicht wird, dass *Strep. mutans* als einer der Erstbesiedler bei der Plaqueformation auftritt. Mutans-Streptokokken spielen somit eine Hauptrolle in der Kariesentstehung (Takahashi und Nyvad, 2008). Zusätzlich exprimieren diese Bakterien verschiedene Iso-Formen von Kollagenasen, welche in der Lage sind, die Bestandteile der organischen Dentinmatrix aufzulösen (Jackson *et al.*, 1997). Weiterhin kann *Strep. mutans* bei einem Überangebot an Zucker diesen intrazellulär speichern und bei einem Nährstoffmangel die gespeicherten Vorräte weiterhin verstoffwechseln (Takahashi *et al.*, 1991; Hamilton, 1976). Wie oben bereits erwähnt ist die Plaque mit verschiedenen Spezies besiedelt, wobei für die Kariesentwicklung, neben Mutans-Streptokokken, insbesondere Arten der Gattung *Actinomyces spp.* aus der Gruppe der Erstbesiedler sowie Vertreter von *Lactobacillus spp.* eine wichtige Rolle spielen. Statistisch signifikante Zusammenhänge wurden sowohl zwischen der Keimzahl von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* bei Kindern ohne bisherige Karieserfahrung ( $r = 0,35$ ,  $p < 0,01$ ) und bei Kindern mit Karies berichtet ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,001$ ) (Tukia-Kulmala und Tenovuo, 1993). Karies kann insofern als chronische, endogene Mischinfektion betrachtet werden, da sie durch Verschiebungen in der Bakterienzusammensetzung der Plaque hin zu einem Überwiegen der säureproduzierenden Keime erklärt werden kann. Dieses Ungleichgewicht fördert die Kariesentstehung (Marsh und Martin, 1999). Besonders in aktiven Initialläsionen („white spots“) fanden sich mit hoher Prävalenz Aktinomyzeten, insbesondere *A. naeslundii* und *A. israelii* (Aas *et al.*, 2008). Dies ist dadurch zu erklären, dass besonders Spezies der Gattung *Actinomyces spp.* unter anaeroben Bedingungen, wie sie in der Tiefe der Plaque vorherrschen, dazu übergehen Kohlenhydrate zu Laktat zu fermentieren (Hogg, 1992). In einer weiteren Studie wurden mittels Anzuchttechniken Keime der Gattung *Lactobacillus spp.* als dominante Gattung in kariösen Läsionen identifiziert (Munson *et al.*, 2004).

Weiterhin sind der hochfrequente Konsum von Mono- und Disacchariden und damit ein ständiges Substratangebot für den Stoffwechsel der Mikroorganismen entscheidend (Gustafsson *et al.*, 1954; Lilienthal *et al.*, 1953).

Zusammenfassend lassen sich somit neben *Strep. mutans*, *A. naeslundii* und *Lactobacillus spp.* als Leitkeime der Kariesinfektion charakterisieren (Corby *et al.*, 2005).

### **1.3.2 Einfluss des Speichels**

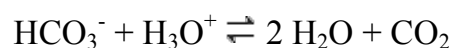
Die Funktionen des Speichels können in allgemeine und immunologische Funktionen unterteilt werden.

#### **1.3.2.1 Allgemeine Funktionen**

Speichel ist ein exokrines, seröses bis mukoseröses Sekret der drei gepaart angelegten Hauptspeicheldrüsen Glandulae parotes, submandibulares, sublinguales und vieler kleiner akzessorischer Speicheldrüsen. Neben dem Hauptbestandteil Wasser besteht der Speichel aus verschiedenen organischen Bestandteilen, wie z.B. Proteinen oder Glykoproteinen und anorganischen Substanzen. Die sezernierte Speichelmenge ist individuell unterschiedlich, wobei als physiologisch eine tägliche Produktion von etwa 700 ml angegeben wird (Sanderink *et al.*, 2004). Je höher die Fließrate ist, desto schneller erfolgt eine Neutralisation von Änderungen des pH-Wertes in der Mundhöhle (Miura *et al.*, 1991). Ebenfalls liegt bei einer hohen Fließrate eine höhere Pufferkapazität vor (Birkhed und Heintze, 1989). Eine reduzierte Speichelfließrate und somit ein vermindertes Schutz- und Abwehrsystems des Speichels kann die Kariesentwicklung verstärken und zu Entzündungen in der Mundhöhle führen (Daniels *et al.*, 1975, van der Reijden *et al.*, 1999). Die Speichelsekretion kann stark durch äußere Einflüsse wie z.B. Medikamenteneinnahme vermindert und verändert werden. Eine Xerostomie kann beispielsweise durch die Gabe von trizyklischen Antidepressiva ausgelöst werden. Dadurch wird das Kariesrisiko beeinflusst, was vor allem an Patienten mit einer stark verminderten Speichelflussrate, z.B. nach Bestrahlung im Bereich der großen Speicheldrüsen, auffällt. So zeigen Patienten mit einer Speichelflussrate von weniger als 0,1 ml/min ein hohes Kariesrisiko mit Entwicklung von mindestens einem neuen kariösen Defekts pro Jahr (Spak *et al.*, 1994). Der pH-

Wert des unstimulierten Speichels beträgt 6,4 bis 7,25, wohingegen der stimulierte Speichel einen pH-Wert um 8,0 hat. Speichelfließrate und Pufferkapazität stehen in einem signifikanten Zusammenhang (Spearman's rank correlation,  $p < 0,001$ ,  $r = 0,51 - 0,60$ ). Ein niedriger pH-Wert ( $\text{pH} \leq 4$ ) wurde nicht im Zusammenhang mit einer hohen Fließrate ( $> 2,0 \text{ ml/min}$ ) gefunden, ein hoher pH-Wert ( $\text{pH} \geq 6$ ) wurde allerdings teilweise selbst bei einer niedrigen Fließrate ( $< 1,0 \text{ ml/min}$ ) gemessen (Tukia-Kulmala und Tenovu, 1993).

Verschiedene Puffersysteme des Speichels dienen zum Schutz der Zahnhartsubstanzen gegen Säureangriffe. Der Speichel verfügt über drei Puffersysteme: dem Bicarbonatpuffersystem, dem Phosphatpuffersystem und den Proteinpuffern. Das Bicarbonat, welcher den größten Anteil am Gesamtsystem hat, bildet mit den freien Oxoniumionen der zugeführten Säuren die schwache Kohlensäure, welche leicht in Wasser und Kohlenstoffdioxid dissoziiert. Somit wird die Säure neutralisiert.



### **1.3.2.2 Immunologische Funktionen**

Generell kann, wie im gesamten Organismus, das Immunsystem des Speichels in ein angeborenes unspezifisches sowie in ein erworbenes adaptives System eingeteilt werden.

Als wichtigster Teil des erworbenen Immunsystems sind hier Gruppen von Plasmazellen zu nennen, welche in der Lamina propria der Mukosa liegen. Diese produzieren nach Antigenkontakt unter Modulation von  $\text{T}_\text{H}2$ -Helferzellen spezifische Antikörper gegen diese Antigene. Der so entstandene Antigen-Antikörperkomplex kann nun von Abwehrzellen als körperfremd erkannt werden. Als Besonderheit im Speichel ist die Sekretion der Antikörper als Dimer in Kombination mit einem sekretorischen Peptid zu nennen. So ist der Organismus in der Lage sich an veränderte Umweltbedingungen, wie z.B. eine Neuinfektion mit einem pathogenen Bakterienstamm anzupassen (Arastéh und Baenkler, 2009).

Das angeborene Immunsystem besteht aus einem weiteren System zur Erkennung von körperfremden Substanzen (Komplementsystem). Dieses System ist eine Kaskade von Plasmaproteinen, welche insbesondere bei der Abwehr bakterieller Infektionen zum

Tragen kommt. Dabei markieren die beteiligten Proteine das pathogene Antigen und ermöglichen so die Phagozytose durch spezialisierte Zellen (Opsonierung). Darüber hinaus stimuliert das Komplementsystem das Immunsystem dahingehen, da einige Bestandteile als proinflammatorische Chemokine wirken und so zu einer Entzündungsantwort beitragen.

Eine weitaus wichtigere Rolle spielt in der Mundhöhle allerdings die Sekretion von antimikrobiell wirksamen Stoffen. Diese können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zum einen sind antimikrobiell wirksame Enzyme anzutreffen (Peroxidasen, Lactoferrin, Lysozyme, Phospholipasen, Calprotectine). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen (Tenovuo *et al.*, 1991).

Zum anderen existieren kleine, aus ca. 30 – 50 Aminosäuren bestehende Peptide. Diese werden als „antimikrobielle Peptide“ (AMP) bezeichnet. AMPs scheinen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr und Kontrolle oralpathogener Keime zu spielen und sind somit ein essenzieller Bestandteil des angeborenen Immunsystems im Speichel (Dale *et al.*, 2006).

## **1.4 Antimikrobielle Peptide**

Die Expression von AMPs wurde, neben vielen anderen Geweben, wie der Haut, und der Mukosa des Magen-Darm-Trakts, auch im Speichel und somit im Bereich der Mundhöhle nachgewiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass sie eine Schutzfunktion gegenüber oralpathogenen Keimen ausüben.

### **1.4.1 Wirkungsweise**

AMPs üben antimikrobielle Funktionen aus, wobei ihre Wirkung synergistisch gegenüber anderen antimikrobiellen Substanzen im Speichel ist. Unter anderem stimulieren sie das erworbene Immunsystem und sind in der Lage die Produktion von IgA und IgG zu erhöhen (Dale und Fredericks, 2004, Nagaoka *et al.*, 2000). AMPs übernehmen zudem eine Schutzfunktion gegenüber der Zahnhartsubstanz vor bakterieller Besiedelung. Dies erfolgt einerseits durch Abtötung der Bakterien und andererseits durch Verhinderung der Ansiedelung kariesfördernden Mikroorganismen im Biofilm auf der Zahnhartsubstanz (Dale und Fredericks, 2005). Die antibakterielle

Aktivität der AMPs wirkt auf die Bakterienmembranen ein (Weinberg *et al.* 1998). Positiv geladene AMPs binden an Lipopolysaccharide in gram-negativen Bakterien, an Polysaccharide in gram-positiven Bakterien und an membranreiche Phospholipide, welche sich mit einer negativen Ladung in der Bakterienmembran befinden (Weinberg *et al.* 1998). Es hat sich gezeigt, dass alle AMPs, die eine  $\alpha$ -Helix-Struktur enthalten, Poren in die Lipid-Doppelmembran einbauen, was zur Zelllyse führt (DeGrado *et al.*, 1982, Christensen *et al.*, 1988, Agawa *et al.*, 1991). Nach einer Untersuchung von Lehrer und Mitarbeitern können AMPs Bakterien des Stammes *Escherichia coli* abtöten, indem die Permeabilität der Bakterienmembran gesteigert wird. Somit wird die Strukturintegrität dieser Membranen beschädigt (Lehrer *et al.* 1998). Durch eine Ionenverschiebung entlang des osmotischen Gradienten zwischen Extra- und Intrazellularraum kommt es zur Ruptur der Bakterienzellen. So sind viele AMPs in der Lage durch den Einbau von Poren in die Bakterienmembran die Permeabilität dieser zu erhöhen. Die Porenbildung wird induziert durch elektrostatische Wechselwirkungen der AMPs mit anionischen Lipiden der Membran (Hancock 1997, Hoover *et al.*, 2003).

#### **1.4.2 Einteilung der AMPs**

AMPs können aufgrund unterschiedlicher Strukturen in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Dazu gehören die Peptide aus der Familie der Cathelicidine und Defensine, die beim Menschen vorkommen und auch in der Mundhöhle relevant vorhanden sind.

##### **1.4.2.1 Cathelicidine**

Aus der Gruppe der Cathelicidine wurde LL-37/hCAP-18 bisher als einziges AMP beim Menschen nachgewiesen (Bals und Wilson, 2003, Abbildung 1). Es gibt nur einen genetisch codierenden Abschnitt für LL-37, der sich auf dem 3. Chromosom befindet (Dale *et al.*, 2006). LL-37 wird in neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen gebildet, ist linear aufgebaut und besteht aus  $\alpha$ -helikalen Peptiden ohne die Aminosäure Cystein (Bals und Wilson, 2003; Tanaka *et al.*, 2000; Weinberg *et al.*, 1998).



Abbildung 1: Struktur von LL-37 (nach Tomasinsig und Zanetti, 2005)

Außerdem wurde LL-37 auch im Speichel entdeckt (Tao *et al.*, 2005). Die mRNA des Cathelicidine-Peptids wurde in Speicheldrüsen und in submandibulären Ausführungsgängen beim Menschen nachgewiesen (Woo *et al.*, 2003). Immunohistochemische Versuche bestätigen, dass sich LL-37 in den Ausführungsgängen der Gl. submandibularis befindet (Tao *et al.*, 2005). LL-37 wird als Propeptid (pre-pro-peptid) synthetisiert und nach der Entfernung des Signal-Peptids bevorzugt in den Granula von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in einer Vorstufe gespeichert. Die genetische Struktur der Cathelicidine besteht aus vier Exons. Die ersten drei Exons codieren für das Signal-Peptid und die pro-Sequenz. Das vierte Exon codiert für das Carboxyl-terminale Peptid (Bals und Wilson, 2003). Der variable Carboxyl-Abschnitt, welcher eine Sequenzlänge von 20 – 100 Molekülen hat, trägt die Abschnitte der antimikrobiellen Aktivität. Die aktiven Domänen liegen im C-terminus von hCAP-18 (Vorläuferpeptid). Das pro-Peptid besteht aus 99 – 114 Aminosäuren (Zanetti *et al.*, 1995) und muss vom C-terminalen Ende entfernt werden, sodass sich die antimikrobielle Aktivität entfalten kann. Die durchschnittliche Konzentration von LL-37 im Speichel lag bei  $15,81 \pm 10,43$  ng/ml (Phattarataratip *et al.*, 2011). Ebenso wurde für LL-37 auf der Oberfläche der Schleimhaut mittels ELISA eine Konzentration von 0,2 – 1,1  $\mu$ M gemessen (Bowdish *et al.*, 2005). Eine Konzentration von 0,3 - 0,7  $\mu$ M konnte bei gesunden Patienten im Sulkusfluid gemessen werden. Im Gegensatz dazu lag die Konzentration bei Patienten mit einer chronischen Parodontitis bei 0,7 – 1,8  $\mu$ M (Turkoglu *et al.*, 2009). Eine weitere Studie kam zu einem Wert von 30,5 ng/ml für gesunde Patienten, 22,5 ng/ml für Patienten mit einer chronischen Parodontitis und 1,8 ng/ml für zahnlose Patienten (Davidopoulou *et al.*, 2013). Dies verdeutlicht die Konzentrationsunterschiede von zahnlosen gegenüber bezahnten Patienten und somit den Zusammenhang der Expression von LL-37 und dem Zustand des stomatognathen Systems. Außerdem

wurde festgestellt, dass Frauen gegenüber Männern eine wesentlich höhere Konzentration von LL-37 hatten (Davidopoulou *et al.*, 2013).

Cathelicidine besitzen die Fähigkeit, das Wachstum der Bakterien zu hemmen (Bals und Wilson, 2003, Guthmiller *et al.*, 2001). Dabei wurde ein breites antimikrobielles Spektrum sowohl gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterienstämme als auch gegen verschiedene Pilzstämme und Protozoen beschrieben (Soravia *et al.*, 1988). Eine Untersuchung von Agerberth und Mitarbeitern zeigte eine hohe Effektivität gegenüber Bakterien der Spezies *E. coli* und *Bacillus megatarium* (Agerberth *et al.*, 1995; Frohm *et al.*, 1997).

#### **1.4.2.2      Defensine**

Defensine sind kleine, arginin-reiche, kationische, 33 – 47 Aminosäuren lange AMPs, mit einem Gewicht von 3,5 – 4,5 kDa (Abbildungen 2 und 3). Die Gruppe der Defensine kann weiterhin in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine eingeteilt werden, wobei Vertreter beider Untergruppen im Speichel entdeckt wurden. Der Unterschied dieser beiden Gruppen liegt in der Anordnung der drei Disulfid-Brücken (Ganz und Lehrer, 1995). Im Unterschied zu den Cathelicidinen liegen die codierenden Gene für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine auf dem 8. menschlichen Chromosom (Dale *et al.*, 2006). Teilweise sind Genabschnitte in dieser Region als multiple wiederholende Kopien vorhanden.

Defensine besitzen sechs Cystein-Moleküle, die intramolekular drei Disulfid-Brücken bilden und die Molekülstruktur stabilisieren (Ganz und Lehrer, 1995; Ganz *et al.*, 1985).

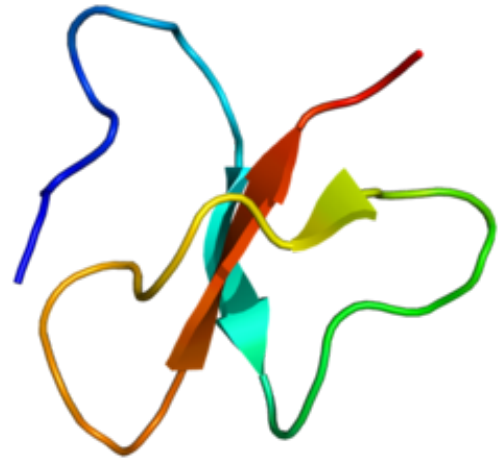
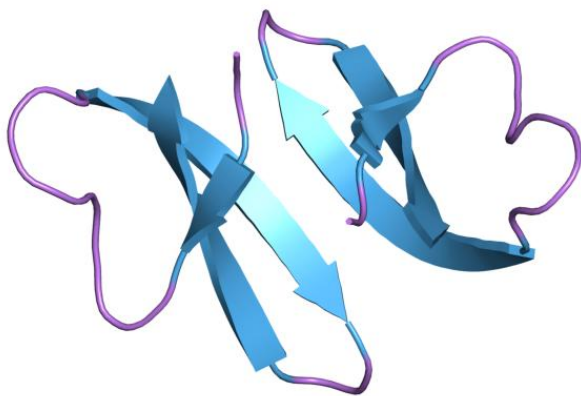


Abbildung 2 und 3: HNP-3 (nach Hill *et al.*, 1991)

HBD-2 (nach Bauer *et al.*, 2001)

Die durchschnittlichen Konzentrationen lagen für das  $\alpha$ -Defensin HNP 1-3 (human neutrophil peptide 1-3) bei  $1,913 \pm 1,157$  ng/ml und für das  $\beta$ -Defensin HBD-2 bei  $0,734 \pm 0,811$  ng/ml (Phattarataratip *et al.*, 2011). Verschiedene Studien lieferten unterschiedlich hohe Konzentrationen für AMPs.

Die unterschiedlichen Konzentrationen sind durch das Vorhandensein verschiedener Polymorphismen in den entsprechenden Genabschnitten teilweise genetisch bedingt. So zeigte eine Untersuchung aus dem Jahr 2010, dass für HBD-1 verschiedene genetische Polymorphismen beschrieben werden können, deren Auftreten mit hohem bzw. niedrigem Kariesbefall korrelierte (Ozturk *et al.*, 2010).

In der Gruppe der  $\alpha$ -Defensine hat man bisher vier unterschiedliche Isoformen, HNP-1 bis -4, entdeckt (human neutrophil peptide, HNP). Alle vier AMPs aus dieser Gruppe sind im Speichel nachweisbar (Abiko *et al.*, 2003). Ebenso wie bei LL-37 wurde HNP-1 bis -3 in den Ausführungsgängen der Gl. submandibularis durch immunohistochemische Untersuchungen gefunden (Tao *et al.*, 2005).  $\alpha$ -Defensine werden als Vorläufer synthetisiert und bevor sie in der Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert werden, proteolytisch gespalten. Die AMPs aus der Gruppe der  $\alpha$ -Defensine können zu größerer Kariesresistenz durch ihr Vorhandensein und die damit verbundene antimikrobielle Aktivität im Speichel führen. Außerdem können sie die Anlagerung des Biofilms auf der Zahnoberfläche verhindern, indem sie an die äußere Bakterienmembran binden und somit die Formation der Bakterien im Biofilm verhindern (Dale *et al.*, 2006).



Humane  $\beta$ -Defensine werden in Epithelzellen von mehreren Organen, wie der Haut, Lunge, Niere, Pankreas, Uterus, Auge und nasaler und oraler Mukosa (Harder *et al.*, 1997) sowie von Speicheldrüsen und deren Ausführungsgängen (Sahasrabudhe *et al.*, 2000) synthetisiert. Somit stellen sie eine erste Barriere gegen Infektionen dar, da sie in Epithelzellen synthetisiert und an die Oberfläche sezerniert werden (Bals, 2000). Es gibt mehr als 30 unterschiedliche  $\beta$ -Defensine, wobei die Defensine HBD-1 – HBD-6 (human beta defensin) bisher beim Menschen entdeckt wurden. HBD-1 wird in vielen Epithelzellen synthetisiert, wohingegen HBD-2 vermehrt in Epithelzellen der Gingiva synthetisiert wird, nachdem sie vorher mit Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , Tumornekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ ) und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) stimuliert wurden (Mathews *et al.*, 1999; Abiko *et al.*, 2003). Eine geringe HBD-2 mRNA-Expression findet auch in gingivalen Keratozyten statt (Mathews *et al.*, 1999). Außerdem stellte sich heraus, dass die für HBD-2 codierende mRNA besonders in entzündetem Gingivaepithel vorhanden ist (Mathews *et al.*, 1999).  $\beta$ -Defensine üben ihre bakterizide Wirkung aus, indem sie die Bakterienmembran angreifen (Lehrer *et al.*, 1998, Joly *et al.*, 2004). Zudem wird in oralen Epithelzellen immunregulatorisch die Expression von HBD-2 und -3 nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen gesteigert (Nishimura *et al.*, 2004). Für HBD-2 ist insbesondere eine bakterizide Wirkung gegenüber *Strep. mutans* beschrieben worden (Nishimura *et al.*, 2004). Defensine leisten somit einen großen Beitrag zum angeborenen Immunsystem, sei es über direkt bakterientötende Mechanismen oder über regulatorische Einflüsse auf das erworbene Immunsystem (Pereira *et al.*, 2013).

### **1.4.3 Effekte von AMPs auf oralpathogene Bakterien**

Empfindlichkeitsstudien zeigen, dass Mutans-Streptokokken von kariesfreien Patienten eine deutlich höhere Anfälligkeit gegenüber LL-37 haben als von Patienten mit aktiver Karies. Zudem zeigte sich eine erhöhte Resistenz der Stämme von Patienten mit erhöhtem Kariesbefall (Phattarataratip *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen somit, dass *Strep. mutans* unterschiedliche Sensibilitäten gegenüber den oben genannten AMPs zeigt. Weiterhin zeigt LL-37 unterschiedlich starke Wirkungen gegenüber verschiedenen Spezies bzw. Stämmen von oralpathogenen Bakterien, wie unter anderem *A. naeslundii* (Ji *et al.*, 2007). Im

Gegensatz dazu zeigten andere Studien, dass LL-37 das Wachstum von bestimmten bakteriellen Spezies nicht inhibiert (Altman *et al.*, 2006).

Betrachtet man die Gruppe der Defensine, so ist man zu folgenden Ergebnissen gekommen: *Strep. mutans* zeigt eine nahezu 50%-ig geringere Anfälligkeit auf HNP-3 im Gegensatz zu HNP-1 (Phattarataratip *et al.*, 2011). Mutans-Streptokokken von kariesfreien Patienten zeigen eine wesentlich höhere Sensibilität gegenüber HBD-2 als HBD-3. Zusätzlich scheint es einen Zusammenhang zwischen dem Kariesbefall eines Patienten und der Konzentration der AMPs zu geben. So zeigte eine Studie von Tao und Mitarbeitern aus dem Jahr 2005 an 11-15-jährigen Kindern, dass höhere Konzentrationen von HNP-1 – 3 und LL-37 in der kariesfreien, im Gegensatz zu den untersuchten Gruppen mit Karies vorliegen. Der Wert von HNP 1-3 lag bei 0,89 µg/ml bei Patienten ohne Karies, wohingegen der Wert bei Patienten mit aktuellem Kariesgeschehen bei 0,5 µg/ml lag. Eine Korrelationsanalyse des Kariesindex und der HNP 1-3 Konzentration lieferte eine hochsignifikante negative Korrelation dieser beiden Parameter (Spearman's rank correlation,  $p = 0,001$ ,  $r = -0,281$ ). Die gleiche Tendenz zeigten Untersuchungen mit LL-37. Somit bestätigte sich, dass das Kariesrisiko negativ mit der  $\alpha$ -Defensin-Konzentration korreliert (Tao *et al.*, 2005).

Die Gruppe der  $\beta$ -Defensine, insbesondere HBD-2, zeigte ebenfalls eine gute Wirksamkeit gegenüber Spezies der Gattung *Streptococcus spp.* (Nishimura *et al.*, 2004). So wurde eine gute antibakterielle Wirksamkeit für höhere Konzentrationen nachgewiesen. Ebenso zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Sensibilität von Stämmen aus kariesfreien bzw. kariesbefallenen Patienten gegenüber HBD-2 (Phattarataratip *et al.*, 2011). Patienten mit marginaler Parodontitis wiesen im Vergleich zu gesunden Patienten wesentlich höhere Konzentrationen an HBD-2 auf. Dies verdeutlicht, dass eine Infektion in der Mundhöhle zu einer höheren Produktion von AMPs führt (Pereira *et al.*, 2013). Die bereits beschriebenen *in vitro* Ergebnisse werden dadurch gestützt. Ebenso steht die Wirkung der AMPs in einem Zusammenhang mit ihrer Konzentration. Bei einer Konzentration von  $> 10$  mg/L zeigen sowohl LL-37 als auch HBD-2 eine bakterizide Wirkung von 100% (Ouhara *et al.*, 2005). Bei einer Konzentration von 500 mM NaCl erzielten die AMPs eine Einschränkung von 22 – 50% der antibakteriellen Aktivität gegen *Strep. mutans*. In

Verbindung mit Speichel zeigte HBD-2 eine antibakterielle Aktivität von 11% und LL-37 keine Wirkung. Ähnliche Ergebnisse lieferte diese Studie für Bakterien der Gattung *Lactobacillus spp.*.

Alle diese Studien verdeutlichen, dass es keine einheitlichen Studienergebnisse, insbesondere im Hinblick auf die Sensibilität kariespathogener Keime gegenüber AMPs gibt.

## **2 Fragestellung und Studienziel**

Im mikrobiologischen Teil dieser Studie soll an von Patienten isolierten kariespathogenen Keimen die Wirkung unterschiedlicher AMPs in verschiedenen Konzentrationen getestet werden. Dazu soll ein orales Biofilmmodell verwendet werden, um die Verhältnisse in der Mundhöhle möglichst realistisch nachzustellen. Als zweiter Schritt sollen Speichelparameter, unter anderem die Konzentration von verschiedenen AMPs im Speichel sowohl zu klinischen als auch mikrobiologischen Befunden korreliert werden, um die Interaktionen zwischen diesen Faktoren zu analysieren.

Dazu sollen von den Patienten anamnestische Daten sowie zahnmedizinische Befunde erhoben werden. Anhand einer Speichelprobe der Probanden sollen die individuelle AMP-Konzentration und unterschiedliche Speichelparameter (Speichelmenge, pH-Wert, Pufferkapazität) gemessen werden. Der Vergleich von klinischen Befunden der Patienten mit den mikrobiologischen und molekularbiologischen Ergebnissen soll Hinweise auf Zusammenhänge zwischen diesen Parametern liefern.

Es wird somit die Hypothese aufgestellt, dass es signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Stämmen mit niedriger Empfindlichkeit gegenüber AMPs und dem individuellen Kariesrisiko gibt. So liegt der Verdacht nahe, dass das Auftreten von solchen Stämmen mit erhöhter Resistenz gegenüber AMPs, sich auch in der Schwere der Erkrankung des Patienten äußert und auch andere Parameter des Speichels einen entscheidenden Einfluss auf das Kariesrisiko des Patienten haben.

Diese Studie soll somit einen Beitrag zum Verständnis der unterschiedlichen Empfindlichkeiten von kariespathogenen Bakterien gegenüber AMPs im Hinblick auf das individuelle Kariesrisiko von Patienten leisten.

### **3 Material und Methode**

Im Folgenden werden alle Methoden beschrieben, die jeweils für den klinischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Teil dieser Arbeit nötig waren.

Zuerst wurden zur Einordnung des Kariesrisikos in einer klinischen Untersuchung der Patienten verschiedene Indizes erhoben sowie Plaque- und Speichelproben entnommen.

Zur mikrobiologischen Auswertung der Plaqueproben erfolgte eine Bakterienkultur auf Selektivnährmedien mit anschließender Speziesidentifizierung mittels massenspektrometrischer Analyse. Nun wurde eine Stammgenotypisierung für jede Bakterienspezies durch AP-PCR vorgenommen, gefolgt von einer Gelelektrophorese, mittels vorher gewonnener genomischer DNA. Daraufhin wurden Biofilmkulturen aller isolierten, genetisch unterschiedlichen Stämme auf die gewählten AMPs hin getestet und analysiert.

Die Speichelproben wurden molekularbiologisch hinsichtlich ihres AMP- und Proteingehalts untersucht. Der Proteingehalt diente hierbei einer Normalisierung der AMP-Konzentrationen in Bezug auf die Gesamtproteinmenge.

Korrelationsanalysen zwischen all diesen Parametern, erfolgten zur Identifizierung möglicher Zusammenhänge. Eine graphische Darstellung des Versuchsablaufs ist der folgenden Abbildung zu entnehmen (Abbildung 4).

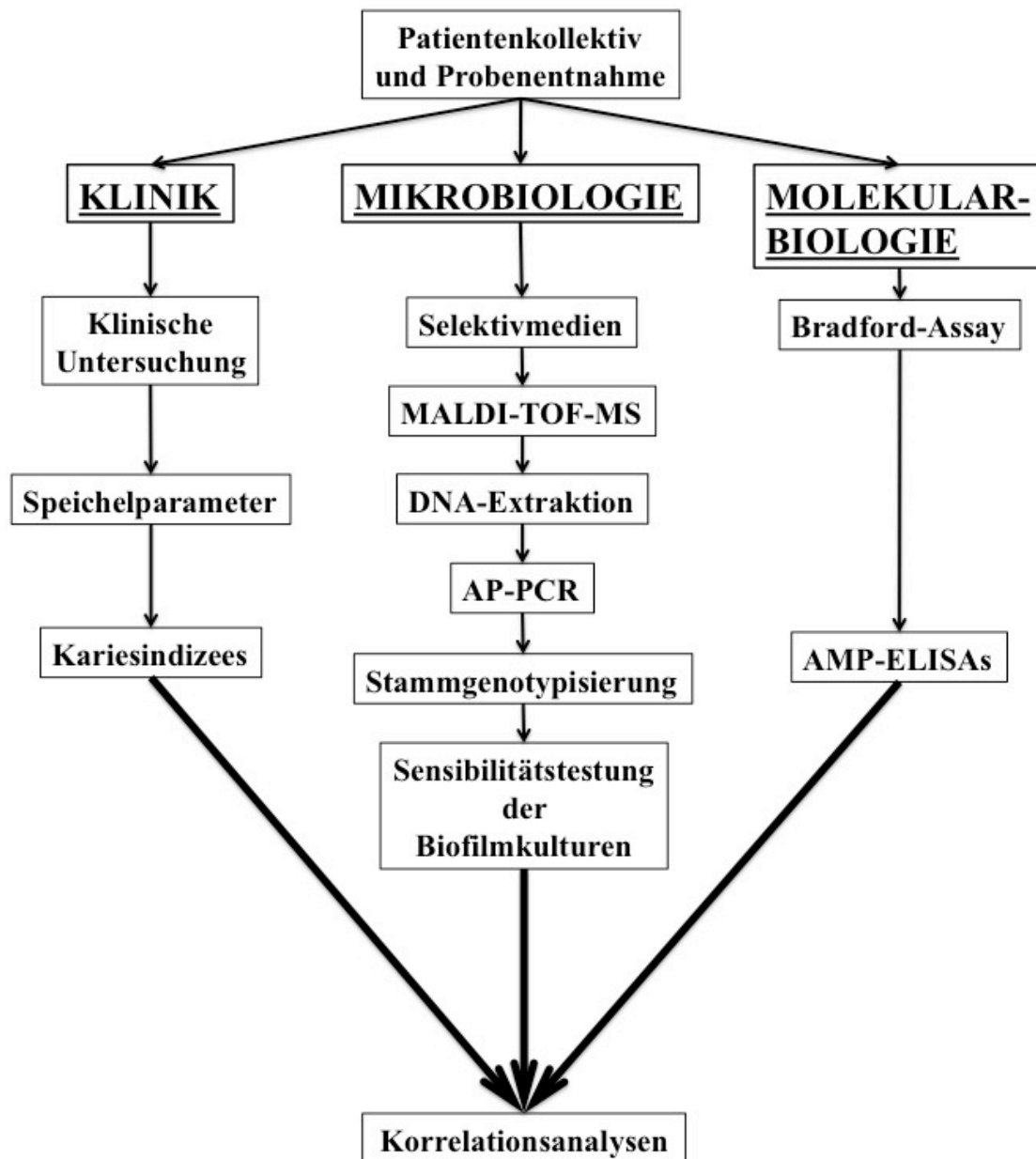


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Studienablaufs

### 3.1 Patientenkollektiv

Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München zur Begutachtung vorgelegt. Diese bestätigte die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit (Nr. 476-12, Votum in Anhang 3).

Das Patientengut rekrutierte sich während des Studienzeitraumes von Januar – Juni 2013 aus Teilnehmern des Phantomkurses der Zahnerhaltung sowie der allgemeinen Ambulanz der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München. Grundsätzlich kamen alle Patienten unabhängig von ihrer Karieserfahrung für die Teilnahme an der Studie infrage. So wurden sowohl Patienten mit akuter oder

vergängerer Karieserkrankung, als auch gesunde Patienten eingeschlossen. Die Patienten wurden nach Alter und Geschlecht stratifiziert (0-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80 Jahre). Ausschlusskriterien waren schwere Allgemeinerkrankungen (insbesondere bekannte Infektionskrankheiten, wie HBV, HCV, HIV, TBC), eine systemische oder lokale Antibiotikatherapie in den letzten 6 Monaten, Störungen der Speichelsekretion (Xerostomie, auch medikamentös bedingt, wie z.B. durch trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin), eine vorangegangene Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich oder Chemotherapie sowie eine aktuelle Immunsuppression, z.B. nach einer Transplantation.

### **3.2 Anamneseerhebung und Befundung**

Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Teilnahme an der Studie und Einwilligung des Patienten erfolgte eine genaue Befragung anhand eines standardisierten Anamnese- und Befundbogens. Ein Muster von diesem sowie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung befindet sich im Anhang (Anhänge 1 und 2). Dabei galt es verschiedene Aspekte, wie die jeweiligen Essgewohnheiten, Angaben zur täglichen Zuckeraufnahme durch Lebensmittel und Getränke, Mundhygiene-Maßnahmen (Zahnputzgewohnheiten, Fluoridierungsmaßnahmen sowie die Benutzung von Zahnseide) zu erfragen. Ebenso wurde ein zahnärztlicher Befund erhoben, um die aktuellen oder bisherigen Erkrankungen in der Mundhöhle zu notieren (aktive oder inaktive Karies, erneuerungsbedürftiger Zahnersatz, Parodontitis). Des Weiteren wurden mehrere Indizes, wie der Plaque Control Record (PCR nach O'Leary *et al.*, 1972), der Parodontale Screening Index (PSI), der DMFT-Index und der Karies-Aktivitäts-Index erhoben. Der PCR-Index dient zur Beurteilung der Mundhygiene. Die Erhebung erfolgte durch Anfärben aller Zähne mit MIRA-2-Ton (Hager Werken, Duisburg, Deutschland). Durch die Darstellung in zwei Farben, neuere Beläge erscheinen rosa, ältere blau, konnte die aktuelle Plaque-Situation auf den Zähnen notiert werden. Für den PCR-Index wurde jeder Zahn in vier Flächen (mesial, distal, oral, buccal) eingeteilt. Die Angabe erfolgte in Prozent und berechnete sich nach folgender Formel:

$$PCR - Index = \frac{\text{Anzahl der plaquebedeckten Flächen}}{\text{Gesamtzahl der Flächen}} \times 100\%$$

Der Parodontale Screening Index (PSI) diente zur orientierenden Untersuchung der Gingiva und des Parodonts. Zusätzlich wurde zur Charakterisierung des aktuellen und vergangenen Kariesbefalls des Patienten, der DMFT-Index bestimmt. Dieser ist der von der WHO eingesetzte Index zur Kariesbestimmung. Zur Erfassung des DMFT-Index wurden alle kavitierten, fehlenden und gefüllten Zähne notiert und folgende Formel zur Berechnung verwendet:

$$DMFT = \text{Kariöse Zähne} + \text{fehlende Zähne} + \text{restaurierte Zähne}$$

Der Karies-Aktivitäts-Index gibt Auskunft darüber, ob aktuell Karies vorhanden ist. Um diesen Index zu bestimmen, wurde die Summe der aktiven und inaktiven Läsionen sowie der insuffizienten Restaurationen gebildet.

### **3.3 Probenentnahme**

Für die Gewinnung der Speichelprobe wurde der Patient aufgefordert 3 min lang auf Paraffinwachs zu kauen, welches Bestandteil eines Kits zur Bestimmung der Pufferkapazität war (CRT-Buffer Set; Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Der über die 3 min entstandene Speichel wurde komplett in einem 50-ml-Falcon-Gefäß (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gesammelt. Die entstandene Menge des Speichels in ml wurde notiert und der pH-Wert des Speichels, auf 0,2 Einheiten genau, mittels Teststreifen (pH-Fix 6,0 - 10; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, Abbildung 5) ermittelt.



Abbildung 5: pH-Teststreifen

Zudem wurde die Puffer-Kapazität ebenfalls mit Teststreifen bestimmt, die Bestandteil des CRT-Buffer Sets waren. Die Puffer-Kapazität wurde den Gruppen hoch, mittel oder niedrig zugeordnet und erfolgte unter optischem Vergleich mit einer Referenzfarbskala (Abbildung 6).



Abbildung 6: CRT-Buffer-Kit



Der restliche Speichelanteil wurde zeitnah in einem Cryo-Röhrchen (Greiner Bio-One) bei -80°C eingefroren, um die Konzentrationen der enthaltenen AMPs zu einem späteren Zeitpunkt untersuchen zu können.

Die Plaqueprobe, zur Isolierung der kariespathogenen Bakterien, erfolgte nach Trocknung der Zähne mit dem Luftpuster, durch Streichen von zwei sterilen Wattepellets (Coltène/Whaledent, Langenau, Deutschland) sowohl okklusal als auch bukkal über den ersten und zweiten Molaren des Oberkiefers (Abbildung 7).



Abbildung 7: Entnahme der Plaqueprobe

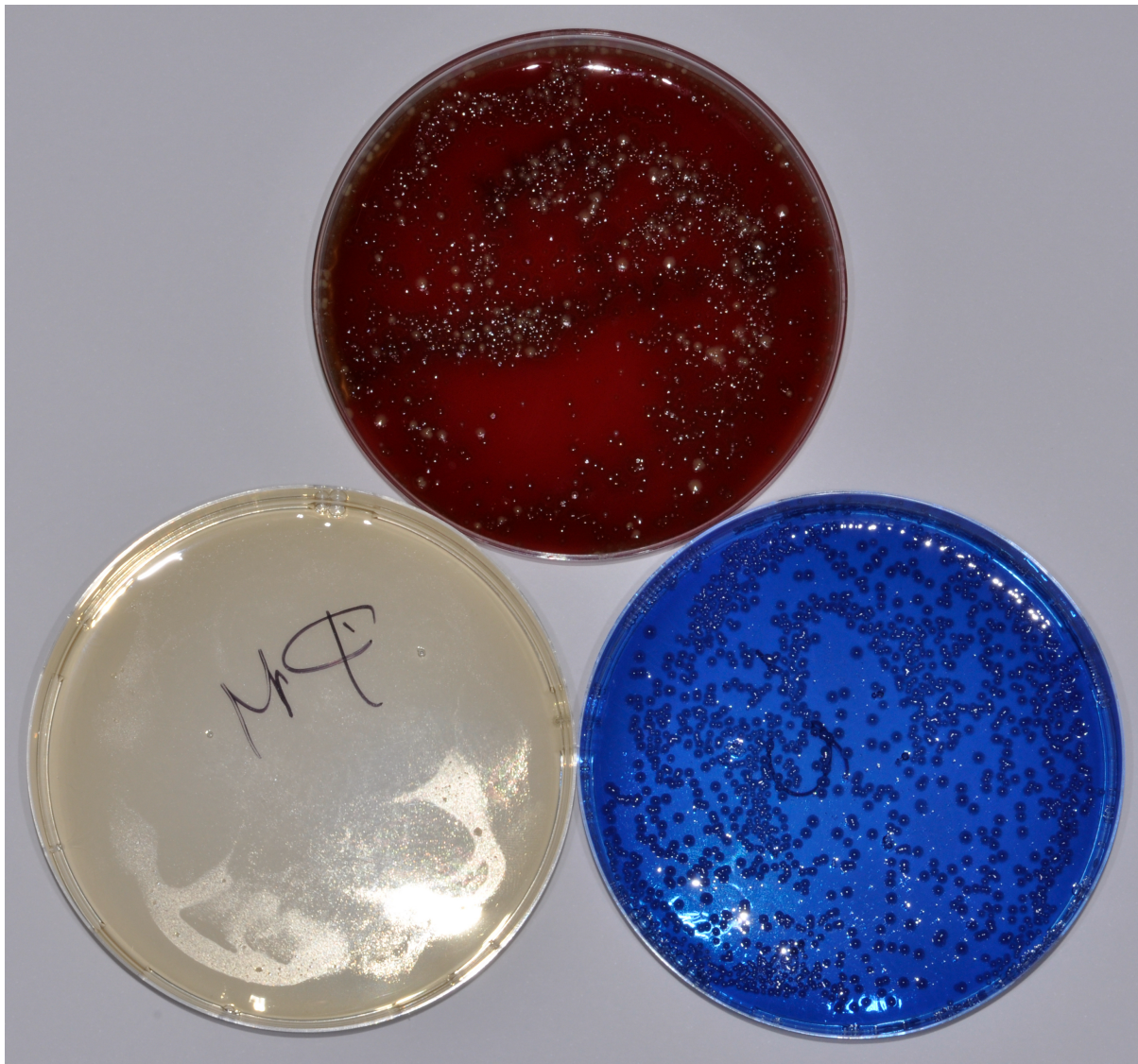
Die Wattepellets wurden sofort in 1000 µl eines Probeentnahmemediums (VMG-II, nach Möller, 1966) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Das entsprechende Medium verhindert sowohl das Wachstum als auch das Absterben der entnommenen Bakterien, sodass eine exakte Quantifizierung möglich wurde (Syed und Loesche, 1972).

### 3.4 Kultivierung und Isolierung der Bakterien

Zunächst mussten die für diese Studie relevanten Bakterien, bevorzugt gram-positive Keime, wie *Strep. mutans*, *Lactobacillus spp.* und *A. naeslundii* aus der Gesamtfloora der Plaque isoliert werden. Zur Anzucht der Bakterien wurden für die jeweiligen Spezies feste Selektivnährmedien verwendet. Die Wirkung der unterschiedlichen

Medien beruhte darauf, dass das Wachstum möglichst aller anderen Keime, außer dem gewünschten, unterdrückt wurde. Zur Anzucht von *Strep. mutans* wurde Mitis-Salivarius-Bacitracin Agar (MSB-Agar; BD, Heidelberg, Deutschland, nach Wan *et al.*, 2002) verwendet. Dem MSB-Agar wurde Kalium-Tellurit und Saccharose zugegeben. Zur Hemmung des Wachstums anderer Keime wurde das Antibiotikum Kanamycinmonosulfat hinzugefügt, welches ein bakterizides Antibiotikum gegen Gram-negative Erreger und *Staphylococcus aureus* ist. Zur Hemmung der Zellwandsynthese anderer Gram-positiver Bakterien wurde Bacitracin supplementiert. Bei dem zweiten Agar, zur Isolierung von *A. naeslundii*, dem Cadmium Sulfate Fluoride Acridine Trypticase Agar (CFAT-Agar), wurde als Basis Tryptic Soy Broth mit Zusatz von D-Glucose verwendet. Zusätzlich wurde Cadmiumsulfat, Acriflavin, Natriumfluorid, Parafuchsin, 5% v/v defibriniertes Pferdeblut und Kalium-Tellurit hinzugegeben (Zylber und Jordan, 1982). Der Lactobacillus-Selection-Agar (Rogosa-Agar, BD) beinhaltet neben Essigsäure das Antibiotikum Vancomycin, gegen das Bakterien der Spezies *Lactobacillus spp.* generell resistent sind (Neumeister *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl Columbia Agarplatten (BD) verwendet. Diese ermöglichten ein gutes Wachstum sehr vieler oraler Bakterien und dienten der Erstisolierung, Anzucht und Kultivierung der Reinkulturen. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Nährmedien ist Anhang 4 zu entnehmen.

Damit sich die gewonnenen Bakterien aus der Plaqueprobe gleichmäßig in dem Probeentnahmemedium verteilen, wurde dieses zunächst eine Minute gevortext. Danach erfolgte eine serielle Verdünnung in 900 µl 0,9%-iger Natriumchloridlösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) jeweils von 1:10, bis zu einer Verdünnung von 1:10<sup>4</sup>. Die Verdünnungsserie wurde vorgenommen, um eine optisch quantifizierbare Koloniezahl auf den Agarplatten zu erzielen. 100 µl jeder Verdünnung wurden auf den einzelnen Agarplatten ausplattiert und danach individuell für 48 – 96 h in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Steri-Cult CO<sub>2</sub> Incubator HEPA CLASS 100 Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), bei einer Temperatur von 37°C, einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5,8% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% inkubiert. Abbildung 8 zeigt 3 Beispiele für Primärkulturen der Plaquebakterien auf den Selektiv-Nährböden.



*Abbildung 8: Bebrütete Platten*

### **3.5 Quantifizierung der Bakterienlast**

Um die Koloniezahlen (Colony Forming Units, CFU/ml) zu bestimmen, wurde je Selektivmedium eine Platte ausgewählt, von der auch die Keime isoliert wurden. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe einer Software zur optischen Erfassung der Koloniezahl (Bio-1D-Software, V11.8, Vilber, Eberhardzell, Deutschland). Dazu wurde die Platte in ein für Chemilumineszenz-geeignetes Auswertgerät (Chemie-Smart 5000; peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gestellt und ein Foto der auszuwertenden Platte unter Weißlicht erstellt. Es folgte eine genaue und Platten-individuelle Eingrenzung des zu zählenden Bereichs und eine automatische Auswertung anhand der Graustufen der fotografierten Keime. Nun konnte die Software einen Zahlenwert für die Koloniezahl auf der jeweiligen Platte bestimmen.



### 3.6 Speziesbestimmung der Bakterien

Nachdem unterschiedliche Kolonien auf den jeweiligen Nährmedien gewachsen waren, galt es zunächst Einzelkolonien herzustellen. Dazu wurden morphologisch unterschiedliche Kolonien von der Agarplatte isoliert und mit einer Impföse, nach der Dreifelderausstrich-Methode, auf eine neue Columbia-Agarplatte ausgestrichen. Die nach ca. 48 h neu gewachsenen Keime wurden optisch kontrolliert um festzustellen, ob es Reinkulturen waren (Abbildungen 9 und 10).



Abbildung 9 und 10: Reinkulturen von *A. naeslundii*

#### 3.6.1 Prinzip der Keimbestimmung mittels MALDI-TOF MS

Die Speziesbestimmung wurde im Max-von-Pettenkofer Institut der Universität München (Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Prof. Dr. Sören Schubert) durchgeführt.

Um die Keime einer Spezies zuzuordnen, wurde eine Untersuchung mit Hilfe einer Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland, Abbildung 11) durchgeführt (Wieser *et al.*, 2012). Dieses Verfahren beruht auf dem Laserbeschuss eines Mischkristalls im Hochvakuum. Dieser Kristall besteht aus Anteilen der mikrobiologischen Probe und einer organischen Matrix. Anschließend werden die Ionisationsprodukte in einem elektrischen Feld (Beschleunigungsspannung  $U = 10 - 30$  kV) beschleunigt. Entsprechend ihrer Ladung und Masse ergeben sich unterschiedliche Flugzeiten zum Detektor. Somit entsteht ein für den Keim spezifisches Spektrum, welches insbesondere im Massenbereich von 4000 – 12000 Da besonders aussagekräftig ist, da in diesem Bereich hauptsächlich ribosomale Proteine

nachgewiesen werden können. Diese Proteine eignen sich zur Spezieszuordnung von Bakterien. Dies ist bei der 16S-rRNA-Genotypisierung schon seit langer Zeit ein häufig angewandtes Standardverfahren. Das so entstandene Spektrum des zu analysierenden Keims wird im Folgenden mit einer ständig aktualisierten Datenbank abgeglichen und einer Spezies zugeordnet. Dabei erstellt die Software einen Faktor für die Validität der Zuordnung, welcher einen Wert größer als zwei annehmen muss, um von einer sicheren Zuordnung ausgehen zu können (MALDI Biotyper V3.1, Bruker Daltonic).



*Abbildung 11: MALDI-TOF-MS*

### **3.6.2 Verfahren der MALDI-TOF MS**

Auf eine MALDI-Probenplatte aus Metall für insgesamt 96 Proben wurde eine stecknadelkopf-große Menge einer frisch gewachsenen Einzelkolonie auf eine markierte, etwa 6 mm durchmessende Analyseposition gegeben. Dies wurde für jeden Keim doppelt durchgeführt. Da in dieser Studie ausschließlich Gram-positive Bakterien analysiert wurden, erfolgte ein zusätzlicher Lyseschritt mittels 70%-iger Ameisensäure. Dazu wurde jeweils 1 µl Ameisensäure auf das aufgetragene Analyt pipettiert, getrocknet und anschließend mit 1 µl eines Zimtsäurederivats ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure; Sigma) als organische Matrix überschichtet (Abbildungen 13 und 14).

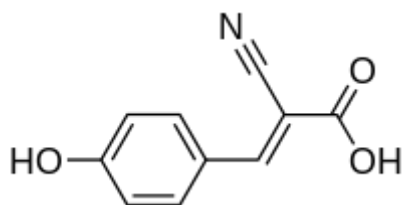


Abbildung 12:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure;  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{CO}_2\text{H}$

Während des Trocknens bildete sich ein Mischkristall aus der Matrix und der mikrobiologischen Probe. Nun wurde die MALDI-Probenplatte in das Messgerät eingeschleust und nach Aufbau eines Hochvakuums automatisch gemessen.

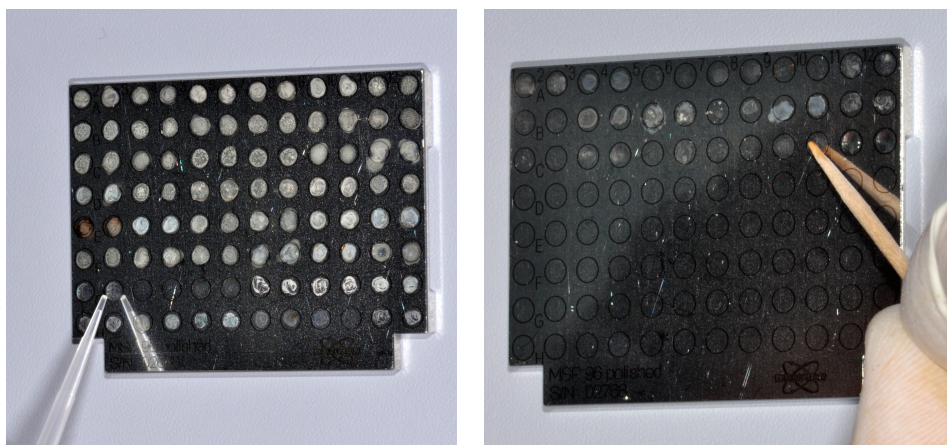


Abbildung 13 und 14: MALDI-Target mit aufgetragenen Proben

Nach erfolgter Spezifizierung wurden alle Spezies verworfen, die nicht den Zielkeimen entsprachen. Bei gewissen Keimen konnte kein eindeutiges Ergebnis mittels MALDI-TOF MS erzielt werden. Grund dafür ist z.B. eine nicht ausreichende Zelllyse oder eine zu geringe Menge an aufgetragener Probe. Diese Keime wurden nach einem speziellen Protokoll extrahiert und erneut analysiert.

In einem Eppendorf-Gefäß wurde eine ca. streichholzkopf-große Menge des Keims in 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ -dest eingerieben und im Anschluss gevortext, sodass eine ausreichend homogene Verteilung des Keims gewährleistet war. Nach der Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  unvergälltem Ethanol (reinst, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde das Gefäß erneut gut gevortext und im Anschluss daran 120s bei 14000 revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute, rpm) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Eppendorf-Gefäß auf Zellstoff ausgeklopft und danach erneut für 120 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde erneut verworfen und das Eppendorf-Gefäß für ca. 60 s offen stengelassen, sodass das restliche Ethanol

verdampfen konnte. Je nach entstandener Pelletgröße wurden 10 – 50 µl 70%-ige Ameisensäure (30 Teile H<sub>2</sub>O-dest mit 70 Teilen Säure gemischt) zugegeben und das Pellet darin resuspendiert. Anschließend wurde die gleiche Menge Acetonitril (100%; Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland) hinzugegeben, gevortext und im Anschluss daran für 120 s bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die extrahierten ribosomalen Zielproteine für die MALDI-TOF MS Analyse. Dazu wurde ca. 1 µl dieses Überstands auf das MALDI-Target aufgetragen und mit Matrix überschichtet.

### **3.7 Stammerhaltung der Zielkeime**

Um eine Stammerhaltung der Zielkeime zu gewährleisten, wurden mehrere Kolonien in ein Cryo-Röhrchen, gefüllt mit 1000 µl der unterschiedlichen Medien, gegeben und gevortext, sodass sich das Material gut in dem Medium verteilte. Dafür wurden folgende Medien verwendet: *Strep. mutans* wurde in Trypticase Soy Yeast Broth (TSYB), *Lactobacillus spp.* in Lactobacilli MRS Broth und *A. naeslundii* in Brain Heart Infusion (BHI) gelöst. Allen Medien wurde 10% Glycerin (Sigma) hinzugegeben, um eine Beschädigung der Zellmembran während des Einfrierprozesses zu verhindern. Es wurden alle Keime doppelt bei -196°C eingefroren.

### **3.8 DNA-Extraktion**

Nach erfolgter Speziesbestimmung wurde die genomische DNA mittels eines Kits (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert, welches mit einem speziellen Lyseprotokoll für Gram-positive Bakterien kombiniert wurde. Um dies durchzuführen, wurde eine Flüssigkultur des Bakteriums hergestellt. *Strep. mutans* wurde in TSYB, *Lactobacillus spp.* in Lacto MSB und *A. naeslundii* in BHI angezüchtet. Es wurden dazu 5 ml des jeweiligen Mediums und zusätzlich 200 µl der aufgetauten Bakteriensuspension in ein 15-ml-Falcon-Gefäß gegeben und über Nacht bei 37°C in einem Orbital Shaker (Thermo Scientific) inkubiert. 100 µl dieser Suspension wurden am nächsten Tag in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und für 10 min bei 7500 rpm in einer Tischzentrifuge (Microfuge 18 Centrifuge; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert, verworfen und das übriggebliebene Pellet in

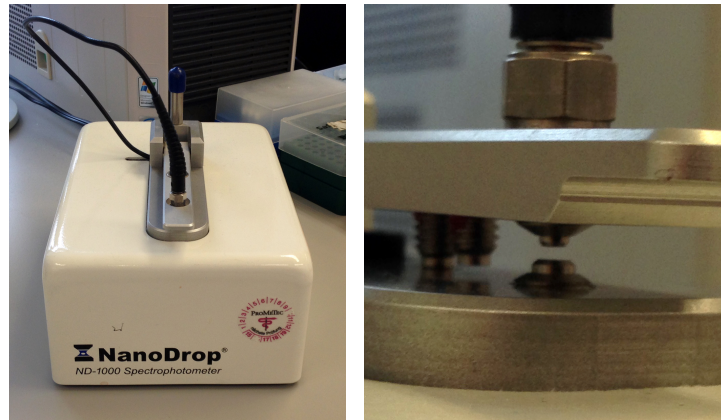
180 µl Lyse-Puffer für Gram-positive Bakterien resuspendiert. Der Lyse-Puffer enthielt Lysozym und Detergenzien zur Lyse der Bakterienzellen. *A. naeslundii* und *Lactobacillus spp.* wurden im folgenden Schritt für 30 min, *Strep. mutans* für 60 min, bei 37°C in einem Eppendorf-Heizblock (Thermo Scientific) inkubiert. Danach wurden 25 µl Proteinase K und anschließend 200 µl Buffer AL in das Eppendorf-Gefäß hinzugegeben und gevortext, um alle Substanzen gut miteinander zu vermischen. Es erfolgte eine erneute Inkubation über 30 min, allerdings bei 56°C. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol reinst (Carl Roth) wurden die Gefäße erneut ausreichend gevortext. Die Zugabe von Ethanol führte bei manchen Proben zu einem weißen, sichtbaren Präzipitat, welches der ausgefällten DNA entsprach. Als nächstes wurde die gesamte Lösung mit dem Präzipitat auf Säulchen pipettiert, die in einem 2-ml-Eppendorf-Gefäß standen. Danach galt es jedes Säulchen mitsamt dem Eppendorf-Gefäß für 60 s bei 8000 rpm zu zentrifugieren und die abzentrifugierte Flüssigkeit inklusive des Gefäßes zu verwerfen. Die DNA blieb bei diesem Schritt auf der Membran des Säulchens zurück. Im Anschluss daran wurden die Säulchen in ein neues 2ml-Eppendorf-Gefäß überführt und es folgte eine Zugabe von 500 µl eines ethanolhaltigen Waschpuffer (Buffer AW1). Nach erneutem Zentrifugieren bei 8000 rpm für 60 s, dem Verwerfen der abzentrifugierten Lösung, inklusive des Gefäßes, wurden die Säulchen in ein neues 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Diesmal folgte eine Zugabe von 500 µl eines weiteren ethanolhaltigen Waschpuffers (Buffers AW2). Beim einem erneuten Zentrifugierschritt für 180s bei einer Drehzahl von 14000 rpm erfolgte die komplette Trocknung der Membran. Auch nach diesem Schritt wurde die abzentrifugierte Lösung mitsamt dem Gefäß verworfen, und die Säulchen wurden in ein neues 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben. Darauf folgte die Zugabe von 200 µl Elutionspuffer (Buffer AE) direkt auf die Membran und eine anschließende Inkubation für 60 s bei Raumtemperatur. Der Elutionspuffer löste die DNA von der Membran, sodass das anschließende Zentrifugieren von 60 s bei 8000 rpm dazu führte, dass die abzentrifugierte Lösung die extrahierte DNA enthielt.

### **3.9 Messung des DNA-Gehalts**

Der DNA-Gehalt der Lösung wurde mittels eines NanoDrop-Systems gemessen (NanoDrop 1000 spectrophotometer, V3.7, Thermo Scientific, Abbildung 15 und 16).



Dieses Gerät kann in sehr kleinen Probenvolumina (1 µl) photometrische Messungen durchführen. Mittels eines magnetischen Messarms wird ein Flüssigkeitssäulchen der zu messenden Probe generiert, was zu einer Messpfadlänge von 0,2 mm führt.



*Abbildung 15 und 16: NanoDrop*

Desoxyribonukleinsäuren zeigen eine charakteristische Extinktion bei 230 nm. Die Höhe dieser Extinktion ist proportional zur Konzentration in der Lösung. Die DNA-Konzentration  $c_{DNA}$  kann über das Lambert-Beer'sche Gesetz nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$c_{DNA} = \frac{A_{230nm}}{\epsilon_{DNA} \cdot b}$$

wobei  $A_{230nm}$  der Absorption bei 230 nm,  $\epsilon_{DNA}$  dem Extinktionskoeffizienten für DNA und  $b$  der Pfadlänge der zu messenden Probe entspricht.

Als Indikator für die Reinheit der extrahierten DNA wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm gebildet, welches laut Herstellerangaben in etwa bei 1,8 liegen sollte, um verunreinigungsfreie DNA-Proben nachzuweisen. Lag eine zu große Verunreinigung der DNA vor, erfolgte eine erneute Extraktion.

### **3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur Bestimmung der genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen einer Spezies wurde für jeden Keim eine arbitrarily primed Polymerase-Kettenreaktion (AP-PCR) durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine PCR unter Verwendung eines beliebigen Primers (10 bp), welche in der anschließenden Gelelektrophorese zu einem

spezifischen Bandenmuster für jeden untersuchten Stamm führte. So konnten genetisch eng verwandte Stämme identifiziert werden.

Die Ansatzgröße für die PCR betrug 25 µl, in denen 2,0 µl 10-fach PCR-Puffer (entspricht 2,0 mM in 25µl), 2,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,0 µl 360 GC Enhancer, 0,2 µl Taq-Polymerase (entspricht 1 U/Ansatz bei 5 U/µl der Stammlösung) und 0,5 µl dNTP-Mix (Endkonzentration von dATP, dTTP, dGTP und dCTP je 50 µM) enthalten waren. Alle Bestandteile waren Teil des „AmpliTaQ 360“ DNA-Polymerase Sets (Life technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), welches sich insbesondere für die Amplifizierung von GC-reichen DNA-Fragmenten, wie sie bei Bakterien regelmäßig vorkommen, besonders gut eignete. Mit dieser Zusammensetzung wurde ein Mastermix hergestellt, dem für jede Spezies verschiedene Primer, mit einer Konzentration von 50 pmol/Ansatz je Primer, hinzugegeben wurden. Alle Primer wurden individuell synthetisiert (Life technologies/Invitrogen), in einer individuell bestimmten Menge H<sub>2</sub>O-bidest gelöst, um eine Stammlösung der Konzentration 100 nmol/ml zu erhalten, anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für *Strep. mutans* wurde eine Kombination aus zwei Primern, 970-11 und OPA-18 für *A. naeslundii* OPB-07 und für *Lactobacillus spp.* OPA-05 verwendet. Die Basensequenz der Primer ist in Tabelle 1 dargestellt.

Primer	Sequenz (5'→ 3')
970-11 ( <i>Strep. mutans</i> )	5'-GTA AGG CCG-3'
OPA-18 ( <i>Strep. mutans</i> )	5'-AGG TGA CCG T-3'
OPB-07 ( <i>A. naeslundii</i> )	5'-GGT GAC GCA G-3'
OPA-05 ( <i>Lactobacillus spp.</i> )	5'-AGC GGT CTT G-3'

Tabelle 1: Basensequenzen der AP-PCR-Primer

Diese Primer wurden im Vorfeld hinsichtlich ihrer Funktionalität für die jeweiligen Spezies getestet. Um alle Ansätze mit gleichen Mengen der jeweiligen DNA zu laden, mussten die DNA-Lösungen individuell in Buffer AE verdünnt werden, sodass stets eine Menge von 35 ng DNA zu dem Mastermix pipettiert werden konnte. Mastermix, Primer und Template-DNA wurden in entsprechender Menge in ein 200 µl PCR-Tube (Kisker, Steinfurt, Deutschland) gegeben und auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O-bidest aufgefüllt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem automatisierten PCR-Reaktionssystem (peqLab) durchgeführt, welches eine exakte Zeit- und Temperatursteuerung ermöglichte. Es folgte eine initiale Denaturierungsphase bei 94°C für 120 s. In dieser Phase schmolzen die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen. Nun folgten 35 Zyklen zur DNA-Amplifikation: Nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 30 s folgte die Primerhybridisierung mit den DNA-Einzelsträngen bei 36°C für 45 s. Anschließend folgte die Elongation bei 72°C für 120 s. Während dieser Zeit synthetisierte die DNA-Polymerase die neuen DNA-Moleküle. Die finale Elongation wurde bei einer Temperatur von 72°C für weitere 7 min durchgeführt.

Nach Abschluss der PCR wurde dem PCR-Produkt 5 µl eines 6-fach konzentrierten DNA-Ladepuffer hinzugegeben (Fermentas / Thermo Scientific). Anschließend wurde eine Ethidiumbromid-Gelelektrophorese durchgeführt, um die PCR-Produkte nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Gel bestand aus 3% Agarose 3:1 (Nu-Sieve, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) in 1-fachem Tris-Borate-EDTA-Puffer, welchem zusätzlich Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml, zugegeben wurde. Ethidiumbromid ist ein interkalierender DNA-Farbstoff, der sich zwischen die Purin-/ Pyrimidinbasen einlagert und unter UV-Licht fluoresziert.

Nach Aushärtung des Gels wurde dieses in eine mit 1-fachem TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und 15 µl des DNA/DNA-Auftragspuffergemisches eines jeden PCR-Produkts in eine Geltasche pipettiert. Für jedes Gel wurden zwei Standard-DNA-Leitern (Low-Range und 100 bp; Fermentas) zusätzlich aufgetragen, um später das exakte Molekulargewicht der Banden der PCR-Produkte ermitteln zu können. Nun wurde für 90 min eine Spannung angelegt ( $U = 10 \text{ V/cm}$ , bezogen auf den Abstand zwischen Kathode und Anode), sodass die negativ-geladene DNA in Richtung der Anode lief (Abbildung 17).

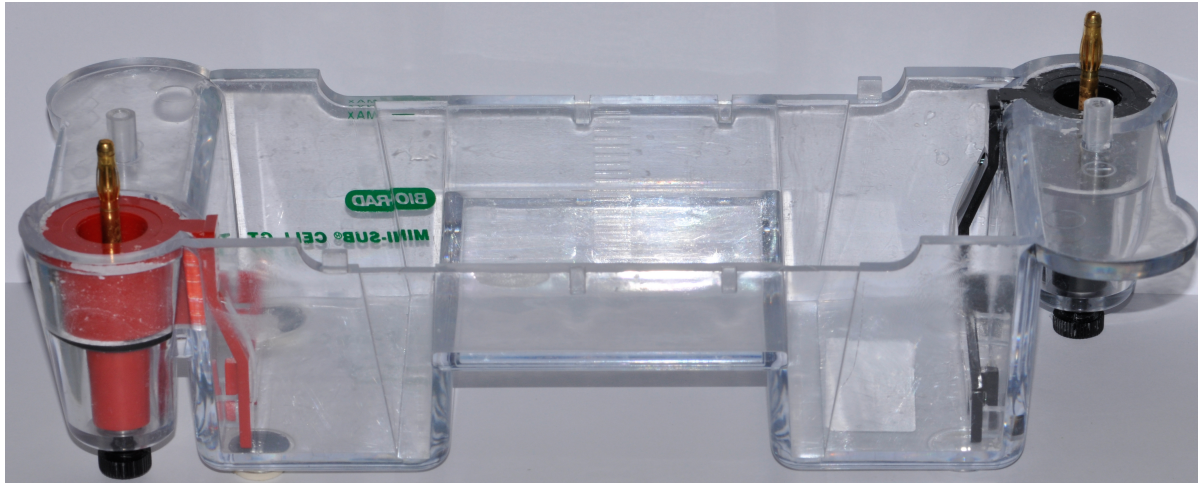


Abbildung 17: Elektrophoresekammer

Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht der Wellenlänge 260 nm fotografiert und als Bilddatei gespeichert (Chemie-Smart 5000, peqLab). Ein beispielhaftes Elektrophorese-Ergebnis zeigt Abbildung 18. Um eine Stammzuordnung vornehmen zu können, wurden die Elektrophoreseergebnisse der einzelnen Keime mittels der Bio-1D Software (V11.8; Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) analysiert. Es wurden Dendrogramme für jedes Spezies erstellt, wobei das Verfahren der „Unweighted Pair Group Method“ mit arithmetischem Mittel verwendet wurde (UPGMA, Otlewska *et al.*, 2013). Dabei wurde die Ähnlichkeit der Abstände zwischen den einzelnen Banden verglichen, um genetisch ähnliche Muster zusammenzufassen (Ähnlichkeitskoeffizient nach Dice 95%).

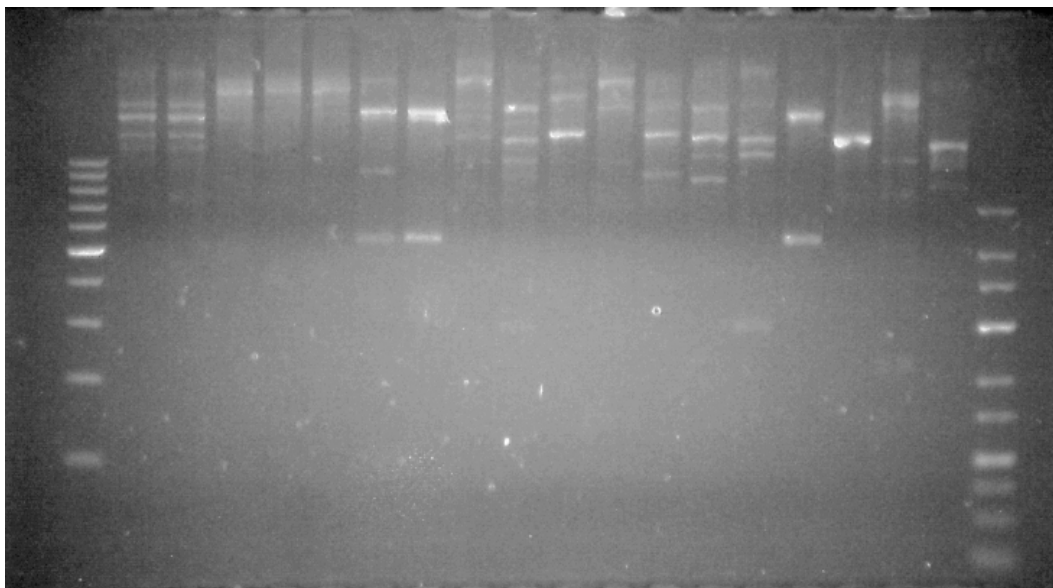


Abbildung 18: Elektrophorese-Auswertung

### 3.11 Anzucht der Biofilme

Für das Medium zur Biofilmanzucht zur Sensibilitätstestung (BMM nach Wong und Sissons, 2001) wurden folgende Feststoffe verwendet: pig gastric mucin, Peptone No. 3, Trypticase, Hefeextrakt und Kaliumchlorid. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von Haemin-, Menadione-, Harnstoff- und Arginin-Lösung. Es wurde ein weiteres Medium, wie oben aufgelistet, hergestellt. Dieses enthielt zusätzlich 1% Saccharose. Um die Anzucht der Bakterien in der Biofilm-Kultur durchzuführen, wurde die eingefrorene Bakteriensuspension zunächst aufgetaut und gevortext. Danach wurden 200 µl der aufgetauten Bakterien-Suspension in 5 ml des jeweiligen Keim-spezifischen Mediums gegeben, BHI für *A. naeslundii*, MSB Lactobacilli Broth für *Lactobacillus spp.* und TSYB für *Strep. mutans* und über Nacht in den Schüttelinkubator bei 37°C und 100 rpm gestellt. Daran anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 3000 x g in der Zentrifuge (Allegra X-22R Zentrifuge; Beckman Coulter) zentrifugiert und das entstandene Pellet in 2 ml BMM resuspendiert. Es wurde eine 48-well-Platte (greiner bio-one) verwendet, welche pro Well mit einer Hydroxylapatit-Scheibe (Clarkson Chromatography Products Inc., South Williamsport, PA, USA), 1,0 ml BMM und 200 µl Bakteriensuspension gefüllt wurde (Abbildungen 19 und 20). Die so vollständig gefüllte 48-well-Platte wurde über Nacht in den CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C, CO<sub>2</sub>-Konzentration 5,8%, relative Luftfeuchtigkeit 60%) gestellt. Tagsüber fand ein Mediumwechsel mit Hilfe einer Absauganlage (biovac 104; Ilmvac, Ilmenau, Deutschland) statt, und die 48-well-Platte wurde für 6 h mit 1,2 ml BMM-1%-Saccharose-Medium pro Well in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Dieser Zyklus wurde insgesamt an fünf aufeinander folgenden Tagen wiederholt, sodass in dieser Zeit ein reifer Biofilm entstehen konnte.

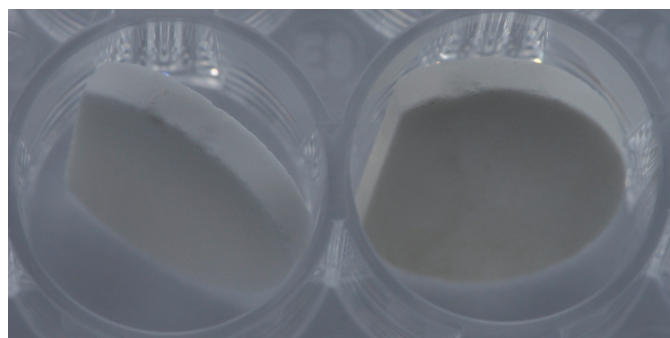


Abbildung 19 und 20: 48-well-Platte mit Biofilm-Disc

### 3.12 Sensibilitätstestung der Biofilme

Für den Empfindlichkeitstest der Biofilme gegenüber Antimikrobiellen Peptiden (AMP) wurden folgende Vertreter der AMPs verwendet: das Cathelicidin LL-37, das  $\beta$ -Defensin HBD-2 und die  $\alpha$ -Defensine HNP-1 und HNP-3. Die Aminosäuresequenzen der Peptide sind in Tabelle 2 dargestellt.

Name des AMPs	Substanzklasse	Aminosäuresequenz
LL-37	Cathelicidin	Leu-Leu-Gly-Asp-Phe-Phe-Arg-Lys-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys-Arg-Ile-Val-Gln-Arg-Ile-Lys-Asp-Phe-Leu-Arg-Asn-Leu-Val-Pro-Arg-Thr-Glu-Ser
HBD-2	$\beta$ -Defensin	Gly-Ile-Gly-Asp-Pro-Val-Thr-Cys-Leu-Lys-Ser-Gly-Ala-Ile-Cys-His-Pro-Val-Phe-Cys-Pro-Arg-Arg-Tyr-Lys-Gln-Ile-Gly-Thr-Cys-Gly-Leu-Pro-Gly-Thr-Lys-Cys-Cys-Lys-Lys-Pro
HNP-1	$\alpha$ -Defensin	Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys
HNP-3	$\alpha$ -Defensin	Asp-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys

*Tabelle 2: Aminosäuresequenzen der AMPs*

Alle AMPs wurden von Peptide Institute (Osaka, Japan) geliefert.

Um den Test der antimikrobiellen Wirkung von Substanzen durchzuführen, mussten diese zunächst präpariert werden. Die vier AMPs wurden in lyophilisierter Form geliefert, daraufhin in PBS (ohne Calcium, Magnesium; pH = 7,4) gelöst und Stammlösungen mit den Konzentration 5  $\mu$ g/ml, 1,5  $\mu$ g/ml und 0,5  $\mu$ g/ml hergestellt. Diese Lösungen konnten maximal vier Wochen bei -20°C gelagert werden. Für die Positivkontrolle wurde Chlorhexidin-Digluconat (CHX, Sigma) und für die Negativkontrolle PBS verwendet. CHX wurde in H<sub>2</sub>O-bidest verdünnt, sodass eine 2%-ige und eine 0,2%-ige CHX-Lösung vorlagen. Die Negativkontrolle bestand aus PBS ohne eine Zugabe von antimikrobiellen Substanzen. Zunächst wurde die mit



Biofilm bewachsene Hydroxylapatit-Scheibe in eine neue 48-well-Platte überführt, mit PBS gewaschen und danach mit 1,2 ml der zu testenden Substanz pro Biofilm-Disc für 10 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde eine Stopper-Lösung (0,3% Lecithin; Carl Roth, 3% Tween 80 Polysorbat; Merck, gelöst in H<sub>2</sub>O-bidest) auf jede Biofilm-Disc pipettiert, nach 60 s wieder abpipettiert und jede Biofilm-Disc in ein 15-ml-Falcon-Gefäß mit 1,5 ml PBS gegeben. Nach einer Inkubation für 120 min und anschließendem kräftigen Vortexen zur Ruptur und Lösung des Biofilms, wurden 100 µl dieser Suspension in eine neue 96-well-Platte (greiner bio-one) pipettiert, um mittels eines biochemischen Nachweisverfahrens die Überlebensrate der Bakterien zu bestimmen. Dabei wurde jede zu testende Kombination doppelt pipettiert.

### 3.12.1 alamarBlue®-Assay

Das alamarBlue®-Assay zur Bestimmung der Überlebensrate der Bakterien beruht auf dem Nachweis der metabolischen Aktivität von Zellen. Es ist dabei gleichermaßen für eukaryontische und prokaryontische Zellen einsetzbar. Dabei wird als Redox-Farbstoff Resazurin von zelleigenen Dehydrogenasen zu Resorufin reduziert. Diese Reaktion findet nur in metabolisch aktiven, lebenden Zellen statt. Damit ist die Menge des Reaktionsprodukts proportional zu der Anzahl an lebenden Zellen (Page *et al.*, 1993). Das Reaktionsprodukt Resorufin zeigt bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 570 nm eine Fluoreszenz-Emission bei 585 nm. Je mehr Resorufin entstanden war, desto höher war die Lichtemission. Die Reaktionsgleichung ist Abbildung 21 und 22 zu entnehmen.

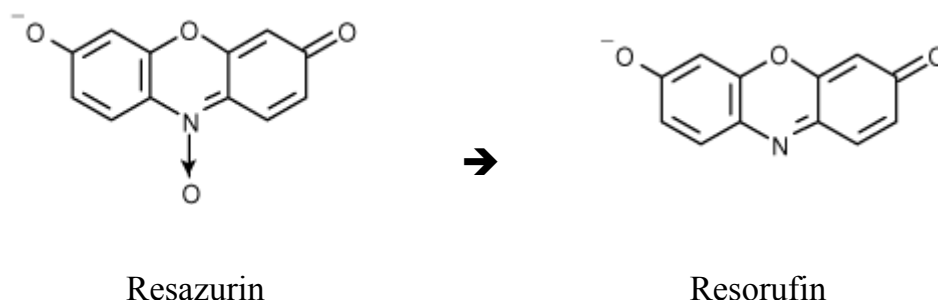


Abbildung 21 und 22: Reaktion des alamarBlue®-Assays

Um das Assay zu starten, wurden 10 µl des alamarBlue®-Reagens (Invitrogen) zu 100 µl jeder zu testenden Probe hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 37°C (Ergebnis siehe Abbildung 23). Die fluorometrische Messung erfolgte anschließend im

Fluorometer (Anregungswellenlänge 570 nm; Emissionswellenlänge 585 nm; Varioscan Thermo, Skantl software V2.2).

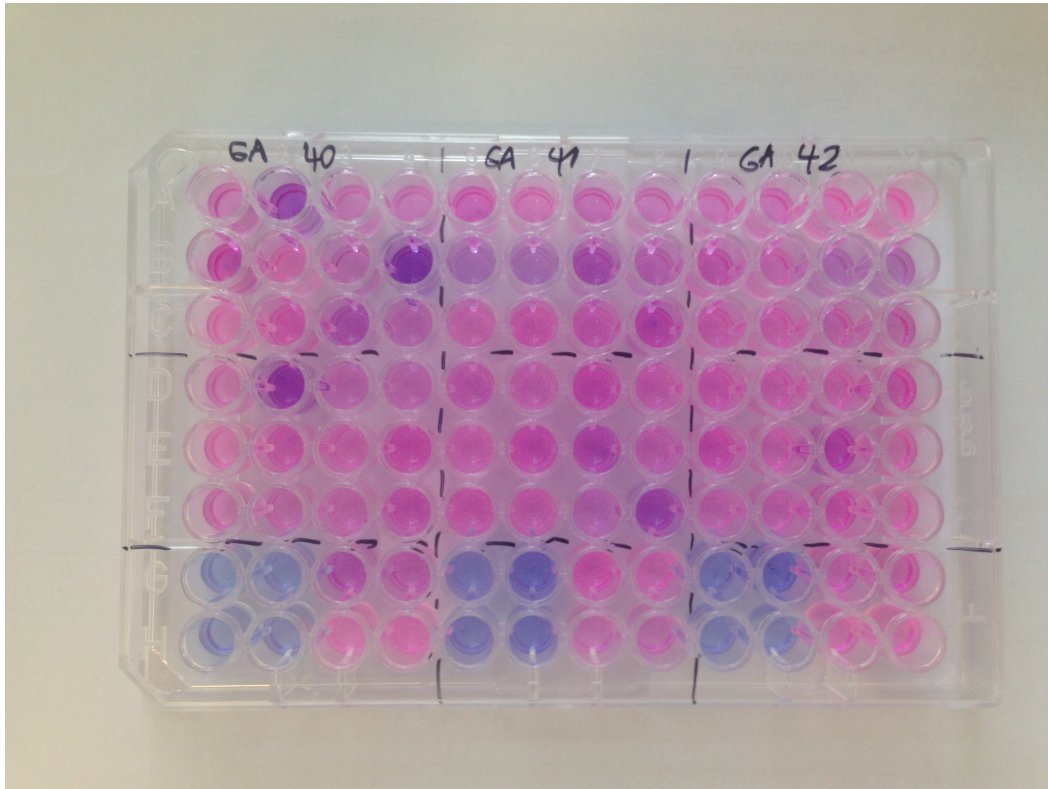


Abbildung 23: alamarBlue®-Platte nach abgeschlossener Reaktion

### 3.13 Risikostratifizierung der Bakterienstämme und Patienten

Um eine Risikostratifizierung hinsichtlich der Sensibilität der einzelnen Keime gegenüber den AMPs vorzunehmen, wurden diese in drei Gruppen (hohes Risiko, mittleres Risiko, geringes Risiko) eingeteilt. Es wurde der Mittelwert der Bakterienreduktion für jede Keimgruppe gebildet. Der Gruppe „mittleres Risiko“ wurden alle Keime zugeordnet, deren Bakterienreduktion im Bereich des Mittelwerts plus/minus der halben Standardabweichung lag. Die Gruppe „hohes/geringes Risiko“ schloss alle Keime ein, die über/unter dem Mittelwert plus/minus der halben Standardabweichung lagen.

Um ein individuelles mikrobiologisches Risiko für jeden Patienten anzugeben, wurde eine Risikozahl aus der Summe der Einzelrisiken der von dem Patienten isolierten Keime ermittelt (hoch = 5, mittel = 3, niedrig = 1). Aus dieser Zahl und der Anzahl der Stämme wurde ein Quotient gebildet, sodass analog zu oben (Mittelwert  $\pm$  halbe Standardabweichung) eine Risikostratifizierung vorgenommen werden konnte. Dies



wurde sowohl für die Gesamtheit der Keime, als auch für *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* einzeln, durchgeführt.

### 3.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration im Speichel der entnommenen Proben zu messen, wurde ein Protein Assay nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dies diente zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen. Dafür wurden 245 µl Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA USA) in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Danach folgte die Zugabe von 5 µl der zu testenden Probe. Zusätzlich wurden 7 Standards (Rinder Albumin; 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml) zur Erstellung einer Kalibrierungskurve in gleicher Weise verdünnt. Es wurden 100 µl des Reaktionsgemisches in eine 96-well-Platte (Greiner Bio-One) gegeben. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Im Anschluss daran erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 650 nm (Beispiel einer 96-Well-Platte mit Bradford-Assay, siehe Abbildung 24).

Anhand der Geradengleichung der Eichkurve konnten ausgehend von den Extinktionswerten der gemessenen Proben die Proteinkonzentrationen berechnet werden.

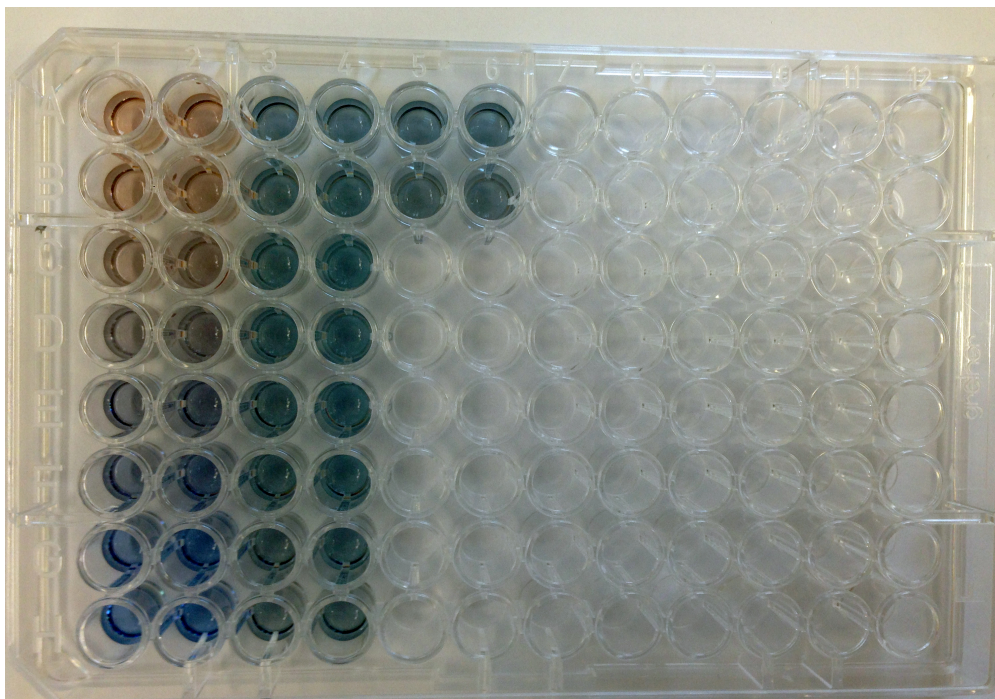


Abbildung 24: 96-well-Platte mit Bradford-Assay (Standart-Reihe und Proben)

### **3.15 Bestimmung der AMP-Konzentrationen**

Im Folgenden galt es die Konzentrationen der vier AMPs LL-37, HBD-1, HNP-1 und HNP-3 im Speichel zu messen. Dazu kamen ELISA-Assays zum Einsatz. Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) gehören zu der Gruppe der Immunassay-Verfahren, diese entsprechen einem antikörperbasierten Nachweisverfahren.

Die verwendeten ELISA-Kits beruhten alle auf dem Prinzip des „Sandwich-ELISAs“. Sowohl das DEF1 Kit für HNP-1 (MyBioSource; San Diego, CA, USA) als auch das DEFB2 Kit für HBD-2 (MyBioSource) beinhaltete eine 96-Mikrotiter-well-Platte sowie ein Enzym-Konjugat, Standards, Stopper-Lösung, Wasch-Puffer und eine Puffer-Lösung zur Einstellung eines optimalen pH-Wertes der Probe für das Assay. Die Mikrotiterplatte war mit einem monoklonalen Antikörper, jeweils speziell gegen HNP-1 und HBD-2 vorbeschichtet worden. Zunächst wurden 50 µl aller Standards und zu testenden Proben je doppelt auf die Mikrotiterplatte gegeben. Danach wurden 5 µl der Puffer-Lösung auf jede Speichelprobe pipettiert und 100 µl eines Enzym-Konjugats (Meerrettich-peroxidase (HRP)-konjugierter polyklonaler Antikörper) hinzugegeben. Während einer Inkubationszeit von 60 min (bei 37°C) banden die Antikörper an die Antigene, in diesem Fall die AMPs. Entsprechend der Konzentration der AMPs in jeder Probe band individuell eine unterschiedliche Menge an Antikörpern und somit auch an konjugierten Enzymen. Dieser Schritt führt zu dem Namen „Sandwich ELISAs“. Nun wurde ein für das Enzym passendes Substrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in äquivalenter Menge jeder Probe zugegeben. Während der folgenden Inkubationszeit von 15 min erfolgte die enzymatisch katalysierte Reaktion zwischen den Substratbestandteilen, die zu einer unterschiedlich starken Blaufärbung, entsprechend der Konzentrationen des Reaktionsprodukts, führte (Reaktionsgleichung Abbildungen 25 und 26). Um die Reaktion zu beenden, wurde eine Stopper-Lösung (Schwefelsäure) hinzupipettiert. Dadurch erfolgte ein erneuter Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde unmittelbar die Lichtabsorption der Proben bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

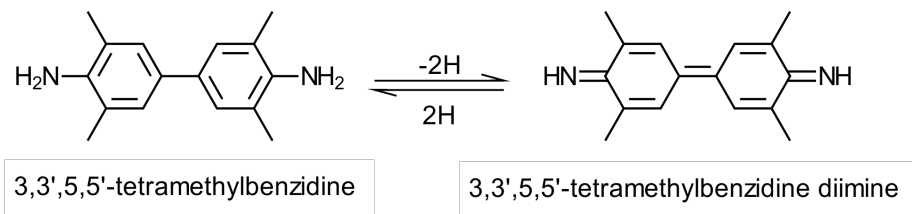
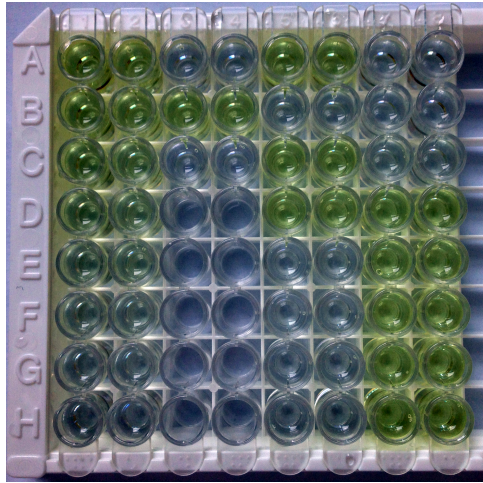


Abbildung 25 und 26: Reaktionsgleichung der Farbreaktion

Der Test für HNP-3 verlief nach dem gleichen Prinzip, jedoch kam hier ein Biotin/Avidin-basiertes System zum Einsatz (MyBioSource). Ebenfalls war hier die 96- Mikrotiter-well-Platte mit einem monoklonalen Antikörper gegen HNP-3 vom Hersteller vorbeschichtet worden. Nachdem die Standards und zu testenden Proben in die Mikrotiter-Platte doppelt pipettiert und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert worden waren, wurden die ungebundenen Mengen der Antikörper abgeschüttet (nicht gewaschen), damit nur die gebundenen vorlagen. Danach wurde ein Biotin-konjugierter Antikörper, spezifisch gegen HNP-3, hinzugefügt. In der folgenden Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C banden die Antikörper an die Antigene. Danach wurde die 96-Mikrotiter-well-Platte mit einem Waschpuffer drei Mal gewaschen. Im Anschluss daran folgte das Hinzupipettieren einer Avidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach einer erneuten Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C folgte ein weiterer Waschvorgang, um alle ungebundenen Enzymkomplexe zu entfernen. Nun wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für die HRP hinzugegeben. Es fand wiederum proportional zu dem Verhältnis der Menge von HNP-3 eine Blaufärbung statt. Im darauf folgenden Schritt wurde Schwefelsäure hinzugegeben, um die Farbreaktion zu stoppen. Anschließend konnten die Lichtabsorptionen der Proben bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen werden (Ergebnis siehe Abbildung 27).



*Abbildung 27: ELISA-Platte nach abgeschlossener Farbreaktion*

Für LL-37 wurde ein Biotin-Streptavidin basiertes ELISA-Assay verwendet (Hycult biotech, Plymouth Meeting, PA, USA). Dabei band ebenso nach Zugabe der Standards und der zu untersuchenden Proben das Antigen (LL-37) an den Antikörper, mit welchem vorher die 96-Mikrotiter-well-Platte beschichtet worden war. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur folgte ein viermaliges Waschen der Mikrotiter-Platte. Danach wurde ein biotinierter Antikörper (ebenso gegen LL-37 gerichtet) hinzupipettiert, welcher an den zuvor entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex band. Nach derselben Inkubationszeit und Temperatur wie vorher folgte ein viermaliges Waschen der Platte. Der im folgenden Schritt hinzupipettierte Komplex aus Streptavidin und HRP band während der folgenden Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur nun an den biotinierten Antikörper. Nach viermaligem Waschen wurde als Substratlösung TMB hinzugegeben. Während der erneuten Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde, entsprechend der vorhandenen Menge an Enzym, das Substrat oxidiert. Dieses Oxidationsprodukt zeigte eine blaue Färbung. Die Enzymreaktion wurde durch das Hinzugeben von Oxalsäure gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte. Auch hier erfolgte im Anschluss daran die Messung der Lichtabsorption der Proben bei 450 nm im ELISA-Reader.

Es wurden Mittelwerte aus den doppelt bestimmten Ergebnissen gebildet und der Leerwert von jeder Zahl subtrahiert. Danach wurden die Wertepaare der Standards in ein Diagramm eingetragen, eine Ausgleichsgerade durch diese Punkte gelegt und die Geradengleichung bestimmt (Microsoft Excel 2003; Microsoft, Redmond, WA, USA).

Anhand dieser Gleichung konnte nun für die gemessenen Absorptionen der Speichelproben die Konzentration der AMPs berechnet werden.

### **3.16            Statistische Auswertung**

Die Darstellung der am Patienten erhobenen Werte, wie Bakterienreduktion und AMP-Konzentration, erfolgte deskriptiv. Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bakterienreduktion zu untersuchen wurde, nach Nachweis der Varianzhomogenität nach Levene, eine univariate Varianzanalyse (oneway ANOVA; Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ , Effektgröße mittels  $\eta^2$ -Statistik) mit anschließendem Post-Hoc-Test (Least Significant difference LSD-Test;  $\alpha = 0,05$ ) durchgeführt.

Um eine Aussage über die Zusammenhänge der einzelnen erhobenen Daten treffen zu können, wurde aufgrund der nicht normalverteilten Daten eine Korrelation nach Spearman durchgeführt (Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient  $r$ , signifikant wenn  $p < 0,05$ , hoch signifikant wenn  $p < 0,01$ ). Dieser Test zeigt bei Signifikanz eine entweder positive oder negative Korrelation der überprüften Datenmengen. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe einer Statistik-Software durchgeführt (SPSS, Version 21, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **4 Ergebnisse**

Um einen Überblick aller Ergebnisse zu liefern, folgt zunächst eine kurze Übersicht derselben.

Zunächst werden die Anamnese- und Befundbögen sowie die klinischen Indizes dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der Speichelanalyse inklusive der AMP-Konzentrationen dargestellt

Im mikrobiologischen Teil erfolgen zunächst die Präsentation der Ergebnisse der Stammgenotypisierung sowie die Keimzahlbestimmung. Weiter werden die Analyseergebnisse der Sensibilitätstestung deskriptiv und mittels ANOVA dargestellt. Dies ist gefolgt von den Ergebnissen der Risikostratifizierung sowohl für die einzelnen Bakterienstämme als auch für die einzelnen Patienten.

Im jeweiligen Ergebnisteil sind zusätzlich immer die Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern angegeben, um signifikante Zusammenhänge aufzuzeigen.

### **4.1 Deskriptive Ergebnisse der klinischen Untersuchung**

In dieser Studie wurden 105 Probanden untersucht, unter denen 67 weiblichen und 38 männlichen Geschlechts waren. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei  $41,7 \pm 18,9$  Jahren. Die Verteilung nach Altersgruppen ist in Abbildung 28 dargestellt.

Insgesamt befanden sich unter den 105 Patienten 17 Raucher, was 16,2% entspricht. Der durchschnittliche Tabakkonsum der Raucher lag bei  $16,3 \pm 12,1$  pack years.

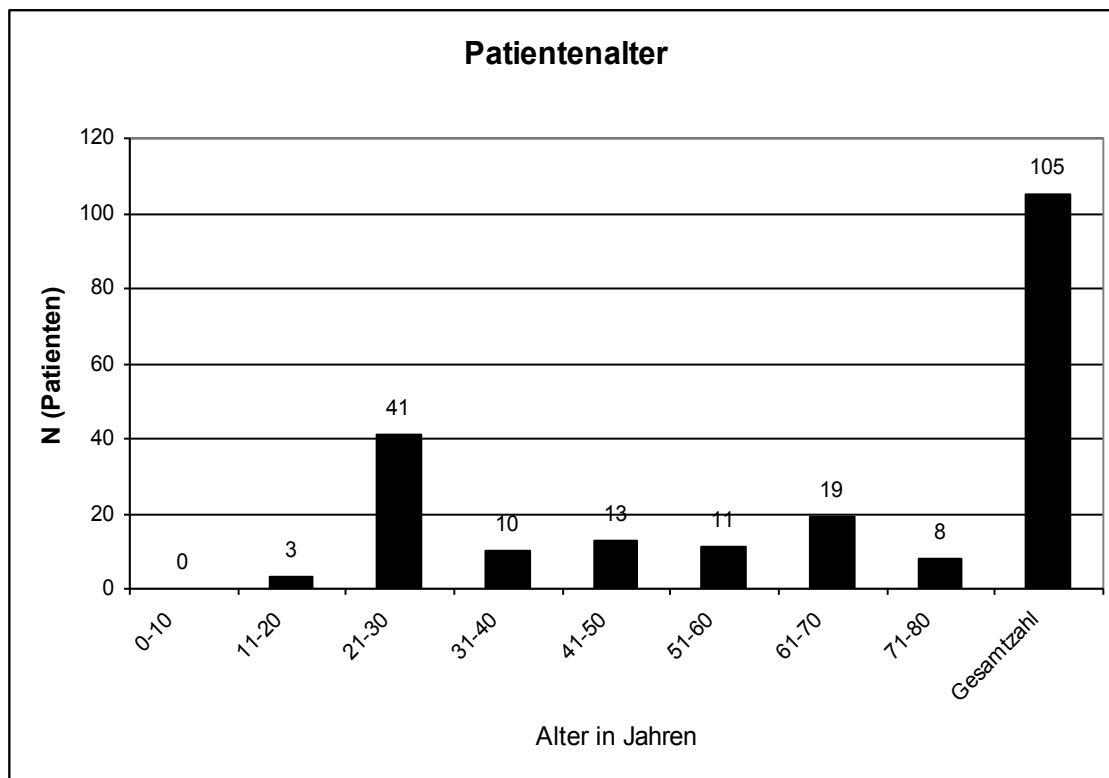


Abbildung 28: Altersverteilung der Patienten

#### 4.1.1 Ernährungsgewohnheiten

Um mögliche Einflussfaktoren aus den Ernährungsgewohnheiten auf die aktuelle Mundgesundheitssituation bestimmen zu können, wurden unter diesem Aspekt vier Parameter ermittelt. Zur genaueren Einteilung des jeweiligen Patienten, wurde die Anzahl der Zwischenmahlzeiten und der Konsum von zuckerhaltigen Getränken erfragt (0-2 / 3-5 / >5). Zudem wurde der tägliche Kaugummikonsum und der Kaffee- und Teekonsum notiert (0 / 1-2 / >2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und 30 dargestellt.

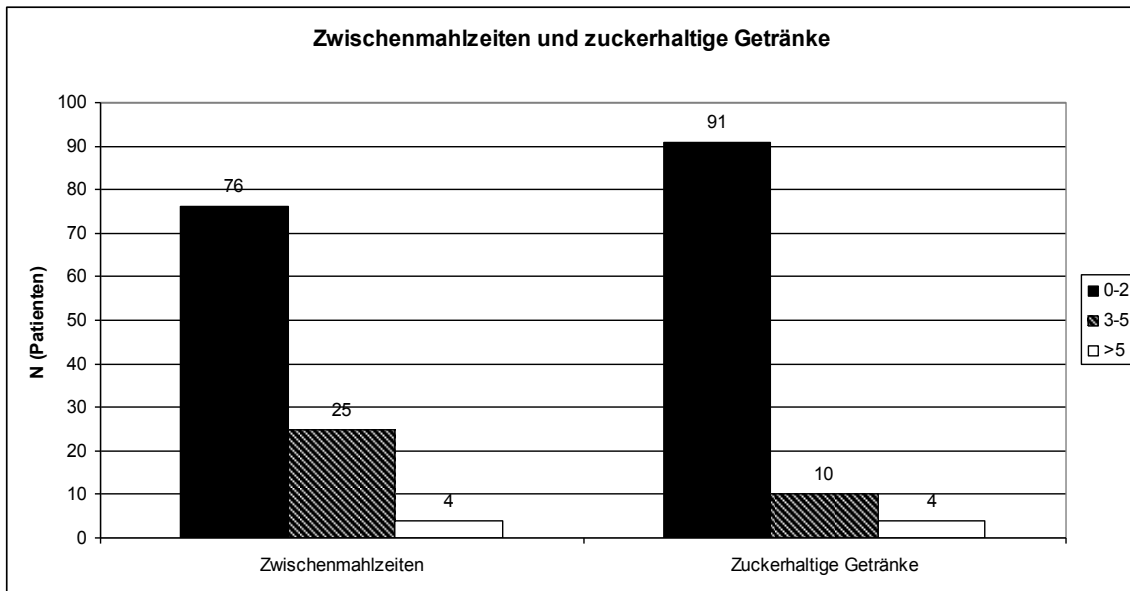


Abbildung 29: Zwischenmahlzeiten und zuckerhaltige Getränke

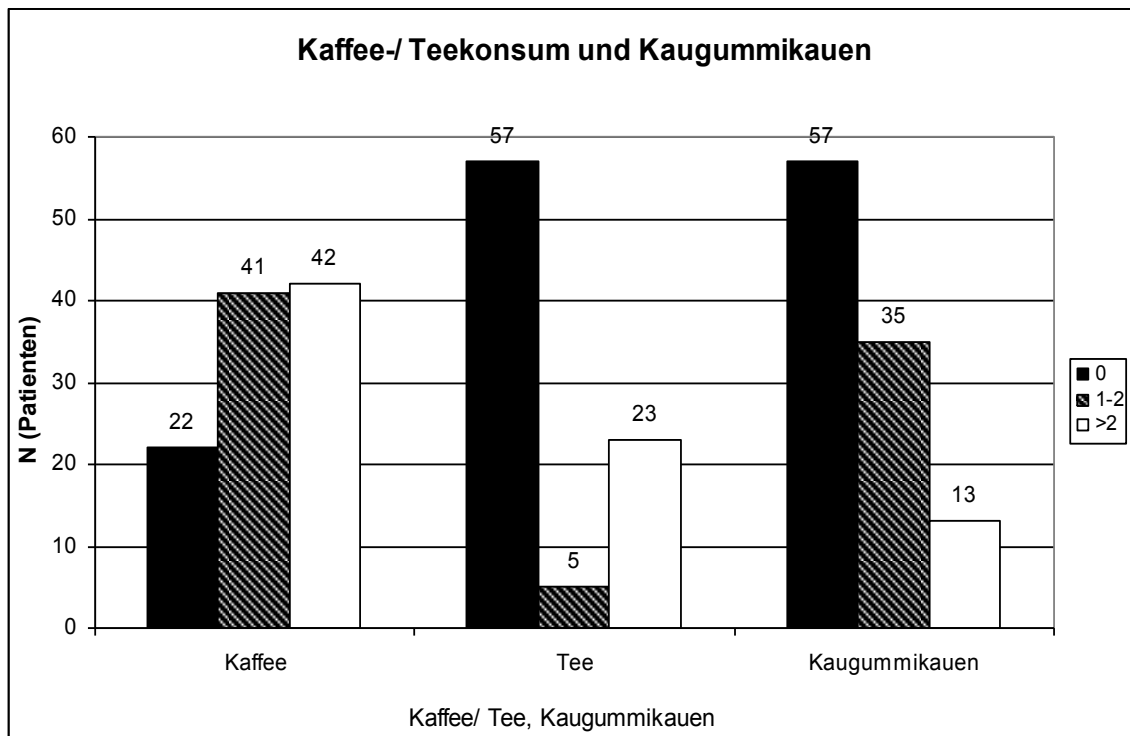


Abbildung 30: Kaffee-/ Teekonsum und Kaugummikauen

#### 4.1.2 Mundhygienemaßnahmen des Patienten

Die Mundhygienemaßnahmen der Patienten wurden anhand verschiedener Aspekte bestimmt. Anamnestisch wurde die Häufigkeit des täglichen Zähneputzens (<1x / 1x / 2x / 3x) und die tägliche Frequenz von Zahnseide erfragt (nie / 2-3x/Woche / 1x/Tag / >1x/Tag; siehe Abbildung 31 und 32). Zusätzlich wurde der Patient nach der Verwendung von fluoridhaltiger Zahnpaste (ja / nein) sowie zusätzlicher



Fluoridierungsmaßnahmen gefragt (keine zusätzlichen / 1 zusätzliche / 2 zusätzliche / 3 zusätzliche). Dies ist in Abbildung 33 und 34 dargestellt.

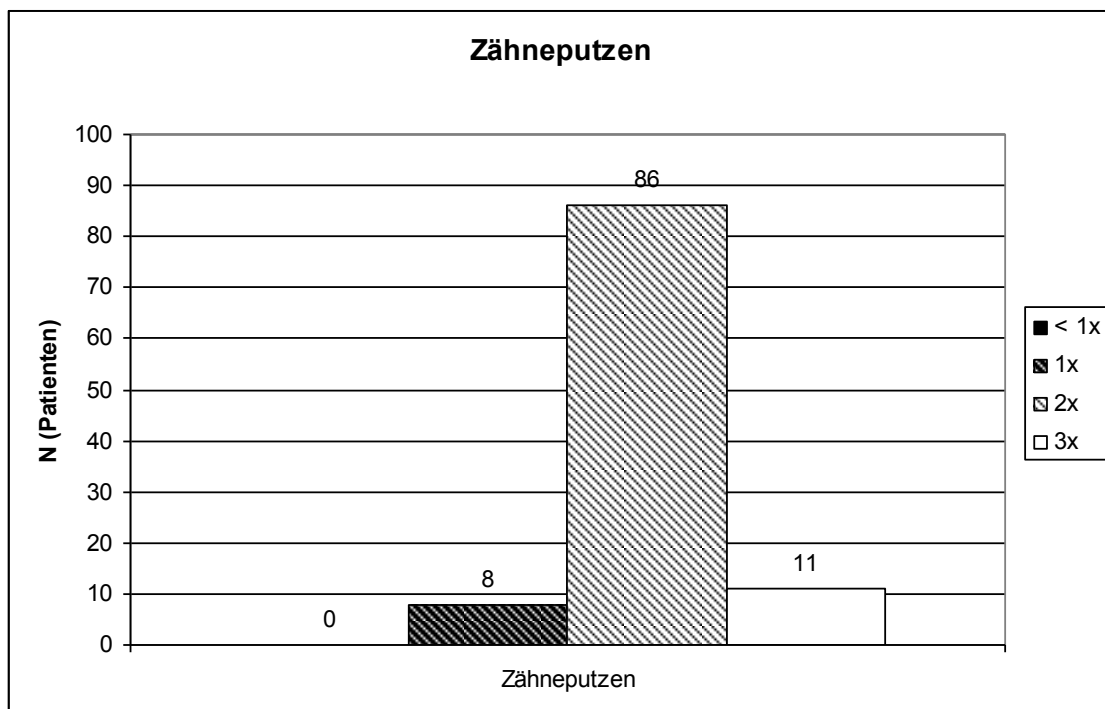


Abbildung 31: Zahnputzverhalten

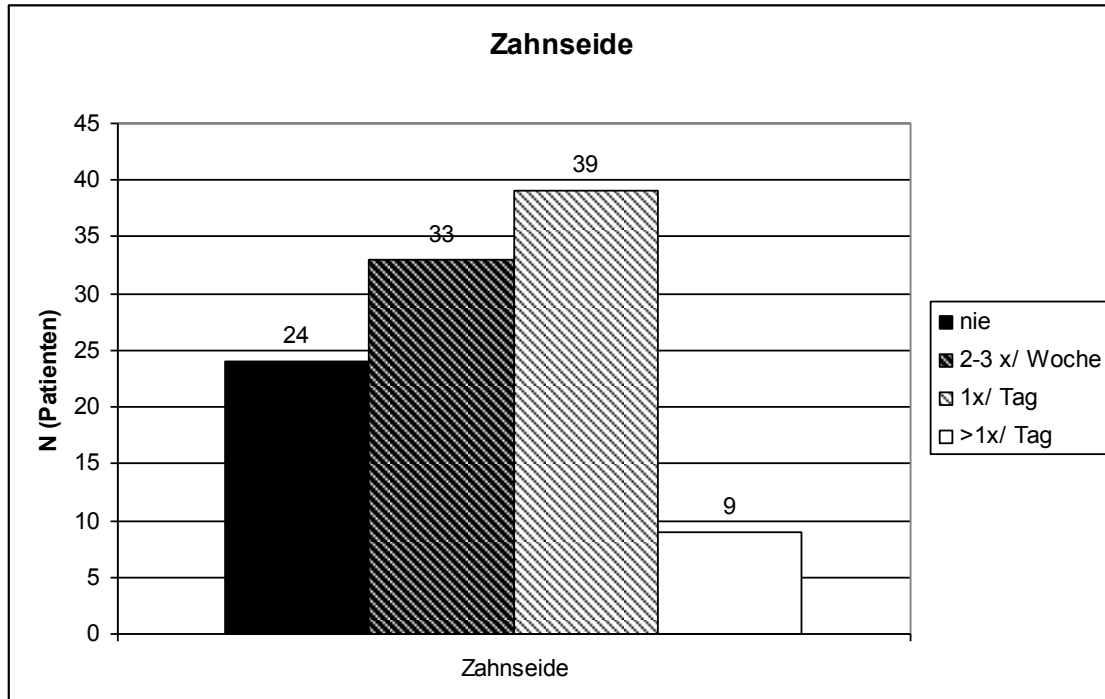


Abbildung 32: Verwendung von Zahnseide

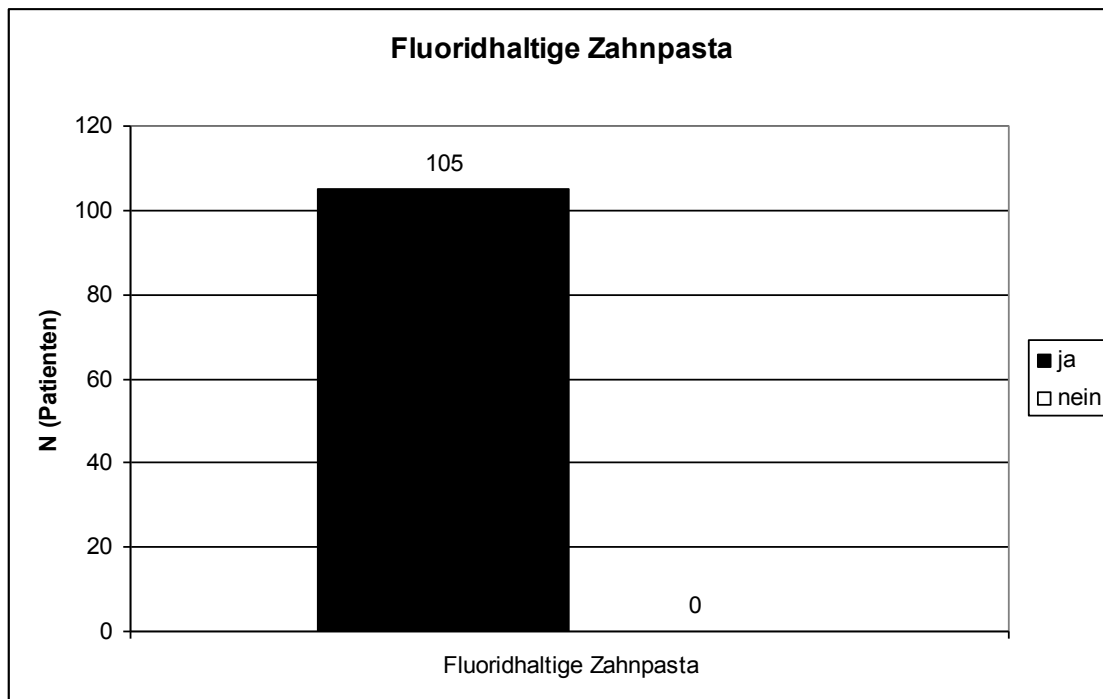


Abbildung 33: Verwendung von fluoridhaltiger Zahnpasta

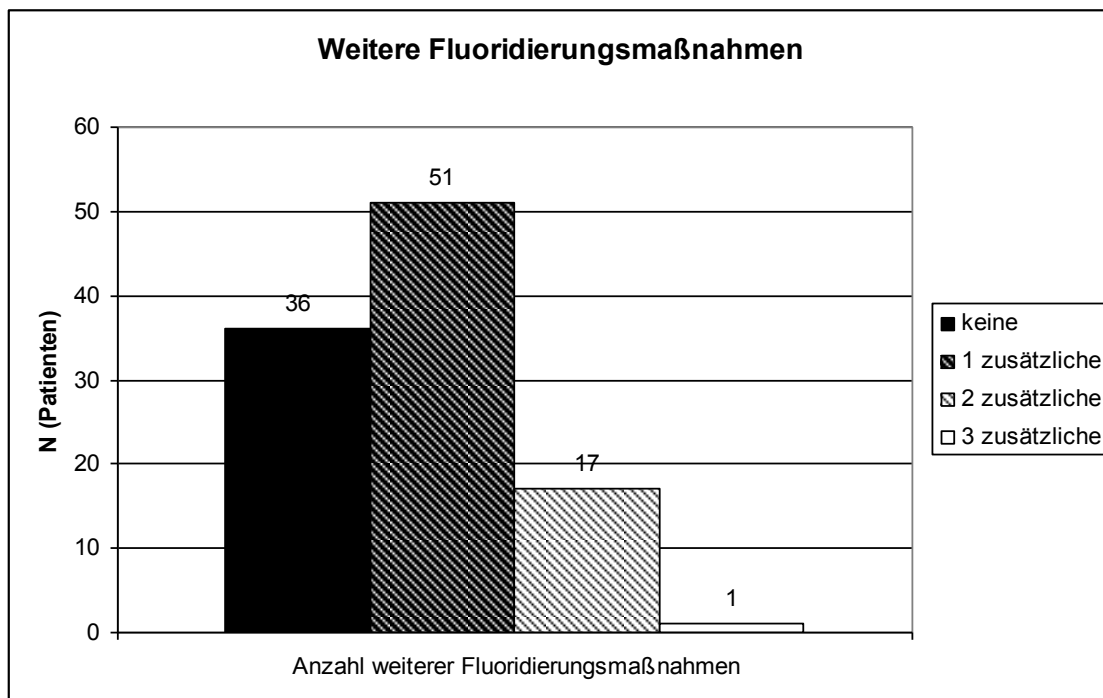


Abbildung 34: Weitere Fluoridierungsmaßnahmen

### 4.1.3 Vergangene Zahnarztterfahrung

Um die vergangene Zahnarztterfahrung der Patienten einzuordnen, wurde der Patient gefragt, ob in der Vergangenheit eine Parodontitisbehandlung stattgefunden hatte (ja / nein; siehe Abbildung 35). Zudem wurde anhand eines zahnärztlichen Befundes festgestellt, ob der Patient mit Zahnersatz prothetisch versorgt war (keiner / festsitzend

/ herausnehmbar; siehe Abbildung 36). Des Weiteren wurde notiert, ob ein Zahnverlust vorlag (nein / durch Karies / durch Parodontitis), was aus Abbildung 37 ersichtlich ist.

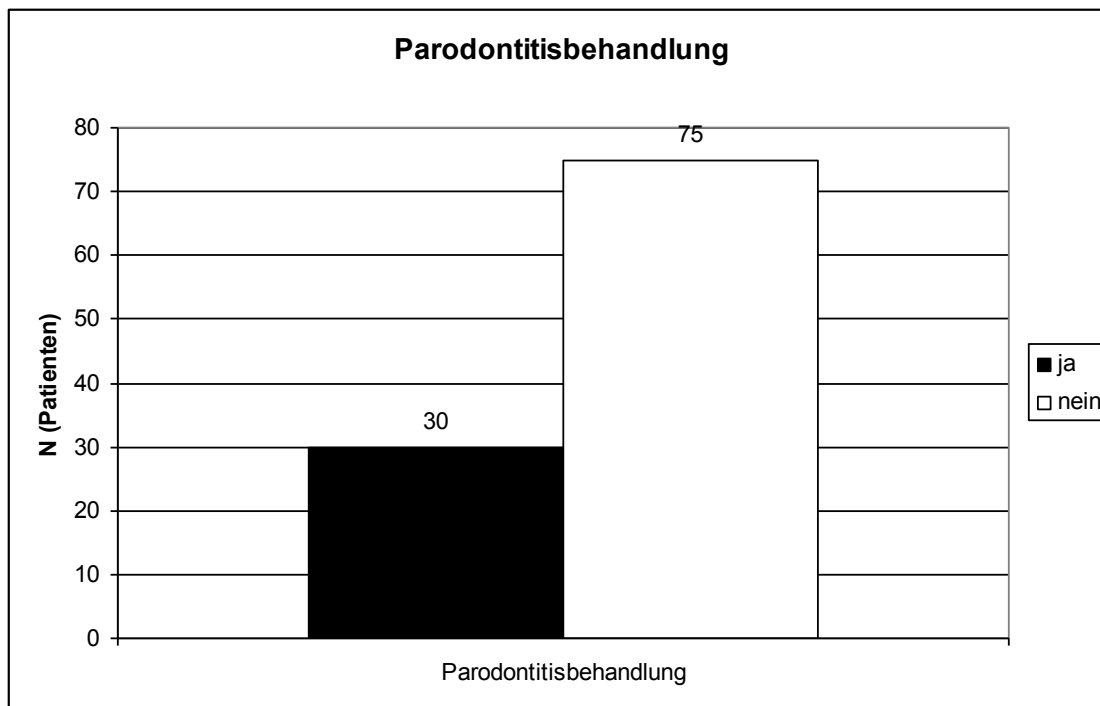


Abbildung 35: Frühere Parodontitisbehandlung

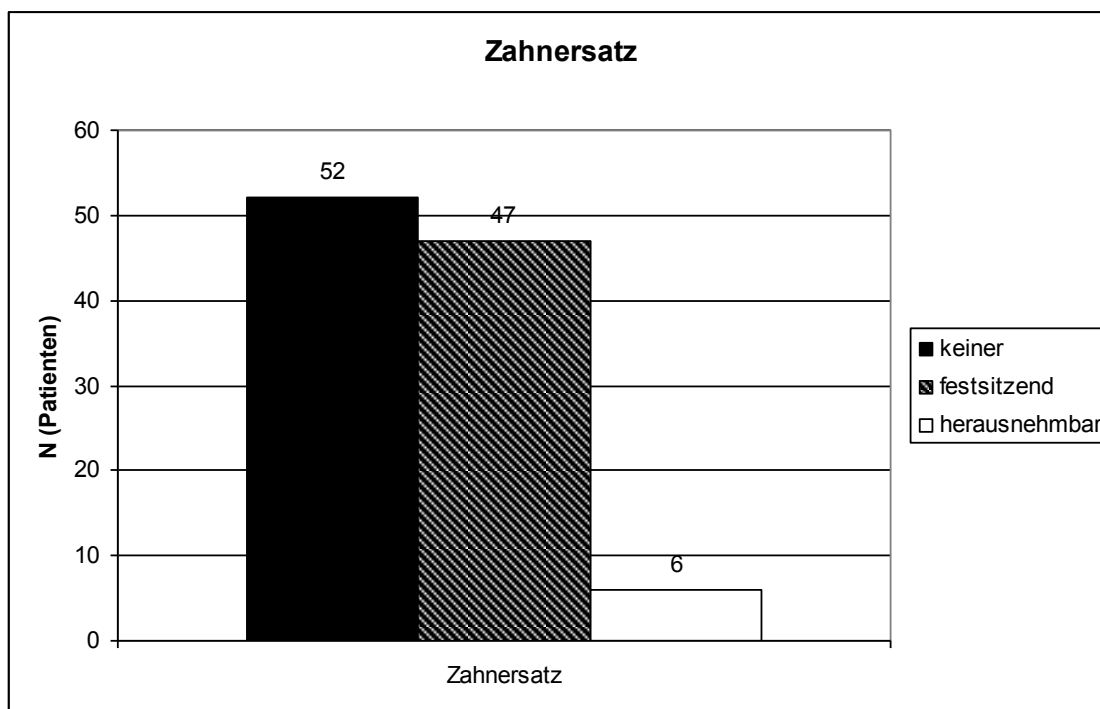


Abbildung 36: Vorhandener Zahnersatz

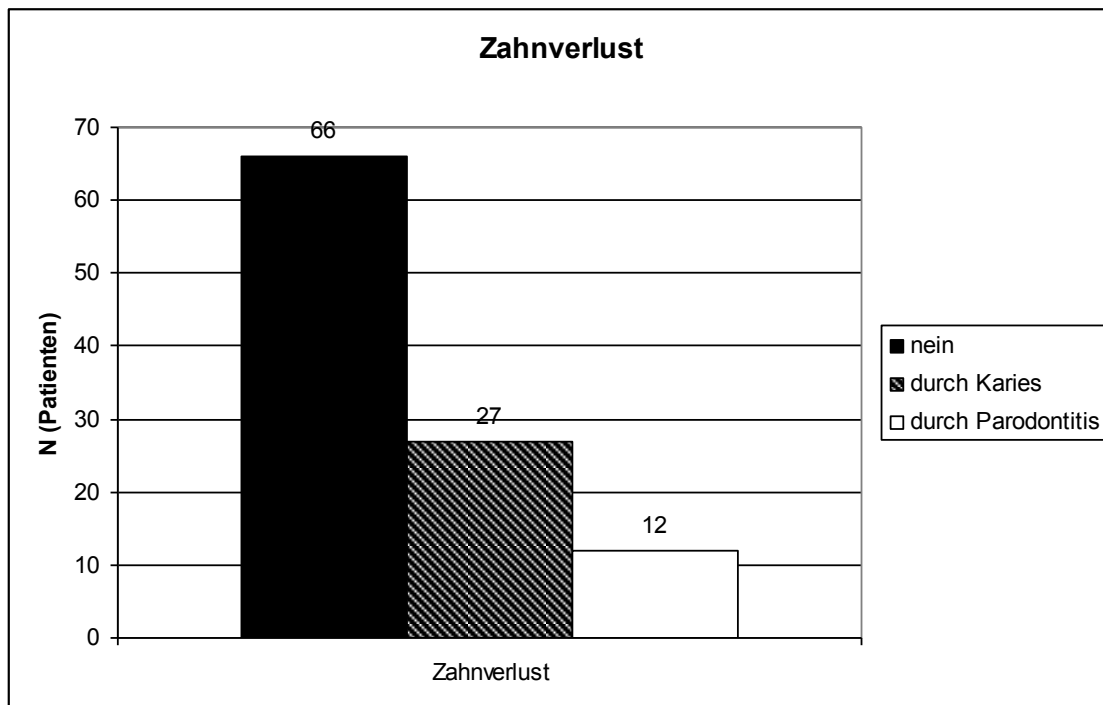


Abbildung 37: Gründe für Zahnverlust

#### 4.1.4 Parodontaler Zustand und aktuelle Mundhygiene

Zur genauen Befundung des parodontalen Zustandes und der aktuellen Mundhygiene wurden sowohl der PSI (1 / 2 / 3 / 4 ; siehe Abbildung 38) als auch der PCR-Index erhoben. Der Mittelwert des PCR-Index lag bei  $8,5\% \pm 10,6\%$ .

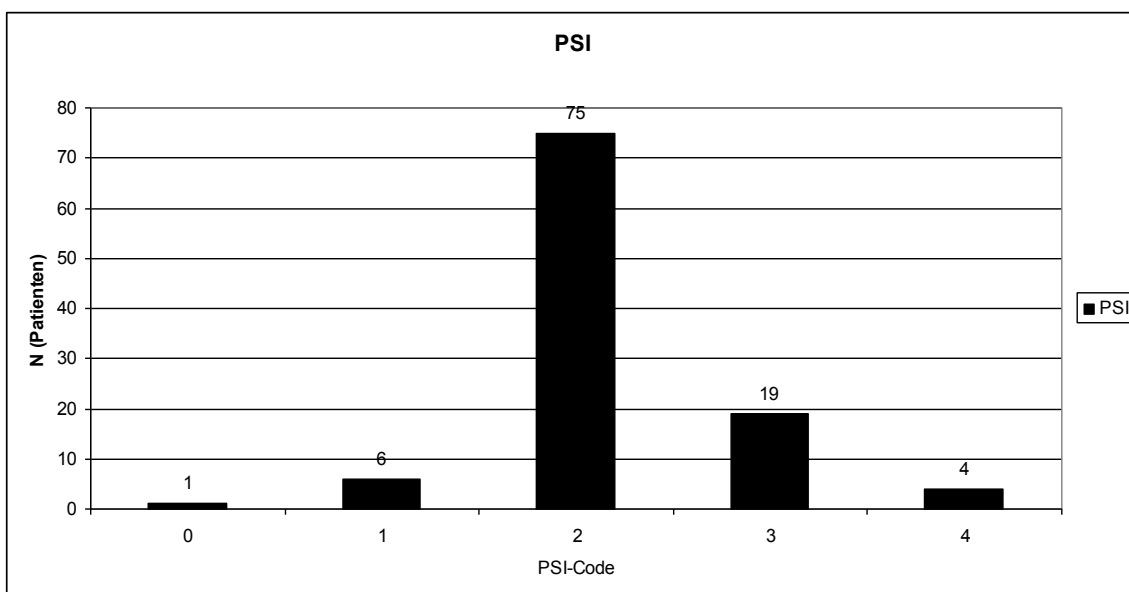


Abbildung 38: PSI-Code

#### 4.1.5 Kariesbefundung

Eine genaue Erhebung des Kariesbefundes im gesamten Patientenkollektiv konnte anhand des DMFT-Wertes vorgenommen werden. Der Mittelwert des DMFT-Wertes betrug  $11,4 \pm 8,7$ . Durch die Angaben des DMFT-Wertes konnten die Patienten in unterschiedliche Kariesrisiko-Gruppen eingestuft werden (niedrig DMFT 0 - 4 / mittel DMFT 5 - 8 / hoch DMFT > 9; siehe Abbildung 39) (nach Tao *et al.*, 2005).

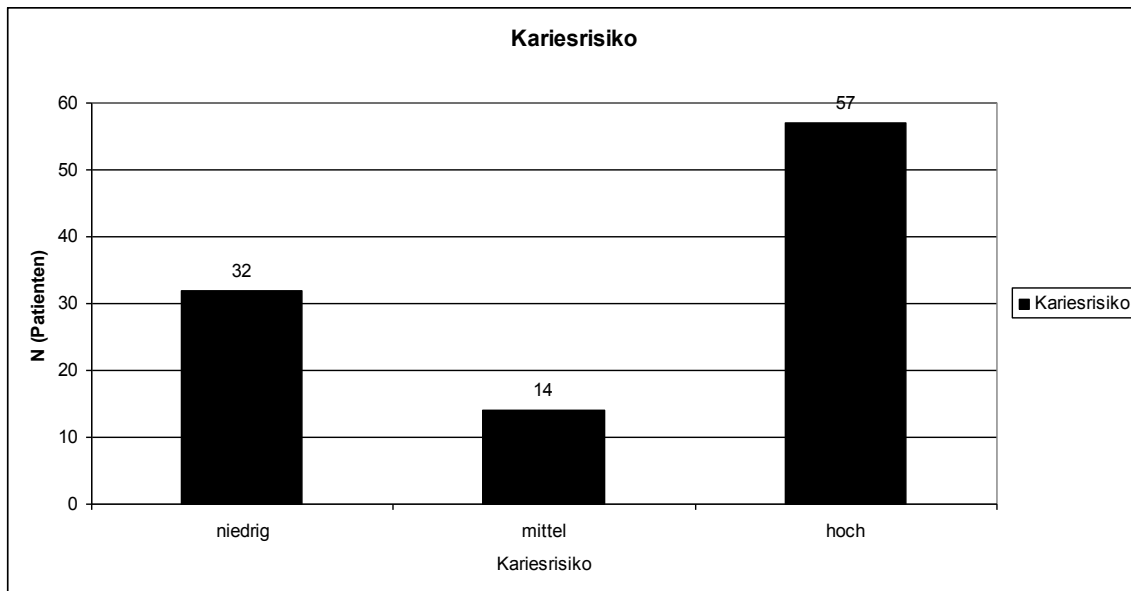


Abbildung 39: Verteilung des Kariesrisikos

Des Weiteren wurde ein Karies-Aktivitäts-Index erstellt, welcher die drei Faktoren „aktive Läsionen“, „inaktive Läsionen“ und „insuffiziente Versorgung“ einschloss. Der Mittelwert des Karies-Aktivitäts-Index, setzte sich aus der Summe der „aktiven Karies“, „inaktiven Karies“ und aller „insuffizienten Versorgungen“ zusammen und lag bei  $5,1 \pm 6,9$ . Zudem folgte anhand des Karies-Aktivitäts-Index eine Einteilung, ob aktuell aktive kariöse Läsionen vorlagen oder nicht. Dies ist aus Abbildung 40 ersichtlich.

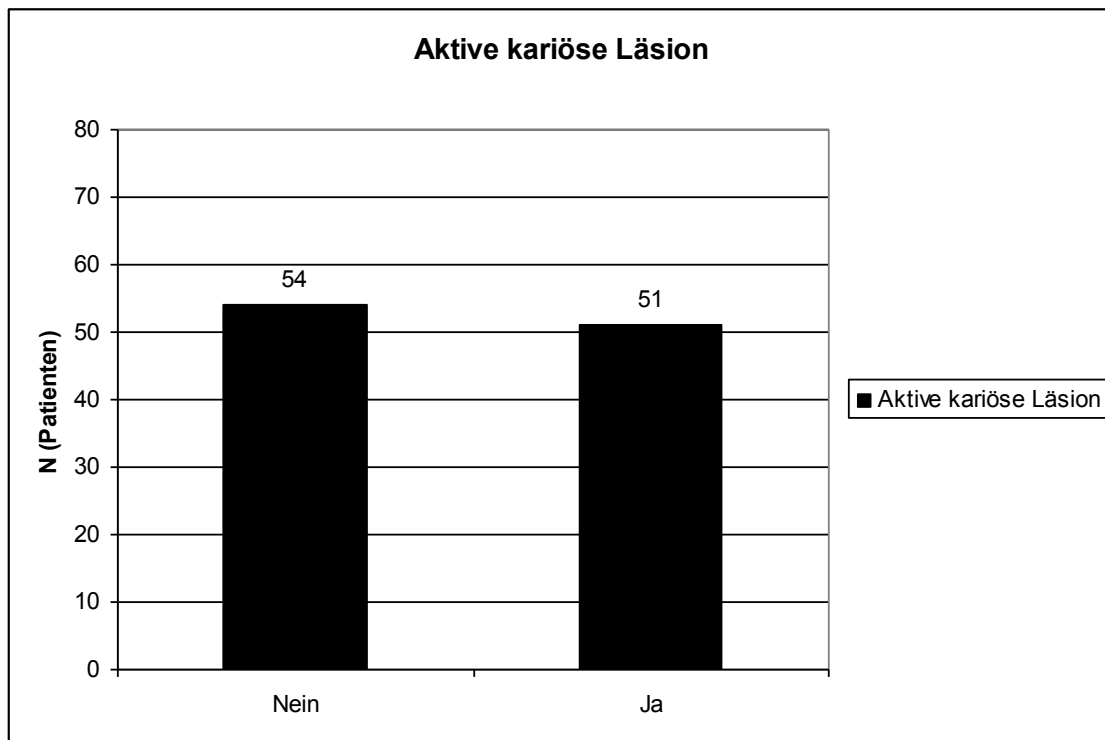


Abbildung 40: Anzahl der aktiven kariösen Läsionen

#### 4.1.6 Speichelparameter

Der Mittelwert des durchschnittlich produzierten Speichels lag bei  $1,4 \pm 0,6$  ml/min. Nach diesem Mittelwert erfolgte die Patienteneinteilung je nach Speichelproduktion (hoch  $> 1,7$  ml/min, mittel  $1,1 - 1,7$  ml/min, niedrig  $< 1,1$  ml/min; siehe Abbildung 41).

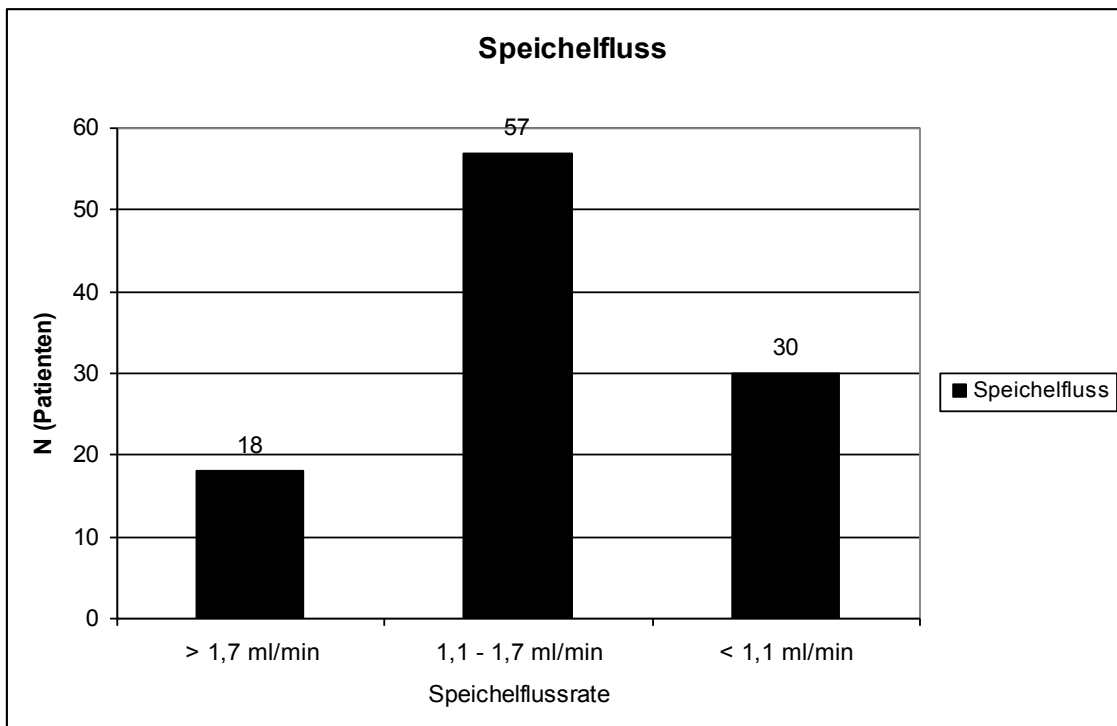


Abbildung 41: Speichelflussrate

Ebenso wurde der Mittelwert für den pH-Wert des Speichels ermittelt, welcher bei  $7,5 \pm 0,5$  lag, sowie die Pufferkapazität gemessen. Die Verteilung der Pufferkapazität ist aus Abbildung 42 zu entnehmen.

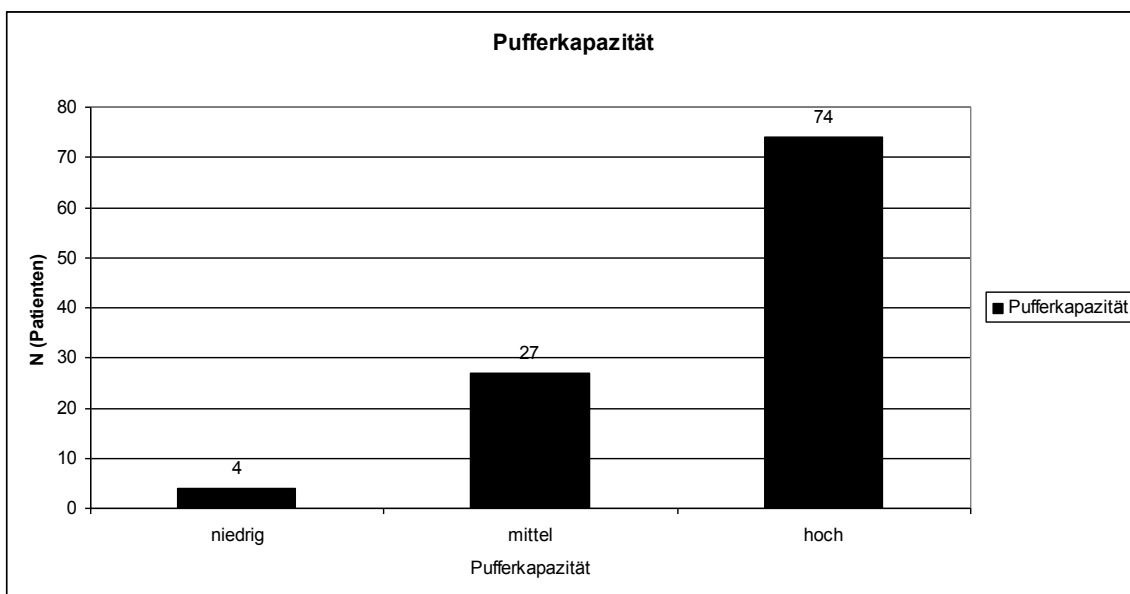


Abbildung 42: Pufferkapazität

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Speichel erfolgte mit Hilfe eines Bradford-Assays. Der Mittelwert betrug  $0,56 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$ . Eine Übersicht über diese deskriptiven Ergebnisse liefert Tabelle 3.

Patientenalter										
Codierung	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	MW	SD
N	0	3	41	10	13	11	19	8	41,7	18,9
Anzahl der Zwischenmahlzeiten / Tag										
Codierung	0-2		3-5			> 5				
N	76		25			4				
Anzahl der Zuckerhaltigen Getränke / Tag										
Codierung	0-2		3-5			> 5				
N	91		10			4				
Kaffeekonsum / Tag										
Codierung	0		1-2			> 2				
N	22		41			42				
Teekonsum / Tag										
Codierung	0		1-2			> 2				
N	57		5			23				
Kaugummikauen / Tag										
Codierung	0		1-2			> 2				
N	57		35			13				
Zähneputzen / Tag										
Codierung	< 1	1			2		3			
N	0	8			86		11			
Zahnseide										
Codierung	nie	2-3 / Woche			1x / Tag		> 1x / Tag			
N	24	33			39		9			
Fluoridhaltige Zahnpasta										
Codierung	Ja				Nein					
N	105				0					
Anzahl weiterer Fluoridierungsmaßnahmen										
Codierung	keine	1 zusätzliche			2 zusätzliche		3 zusätzliche			



<i>N</i>	36	51	17	1	
Parodontitisbehandlung					
<i>Codierung</i>	Ja		Nein		
<i>N</i>	30		75		
Zahnersatz					
<i>Codierung</i>	keiner	feststehend	herausnehmbar		
<i>N</i>	52	47	6		
Zahnverlust					
<i>Codierung</i>	nein	durch Karies	durch Parodontits		
<i>N</i>	66	27	12		
PSI-Code					
<i>Codierung</i>	0	1	2	3	4
<i>N</i>	1	6	75	19	4
Kariesrisiko					
<i>Codierung</i>	niedrig	mittel		hoch	
<i>N</i>	32	14		57	
Aktive kariöse Läsionen					
<i>Codierung</i>	Ja		Nein		
<i>N</i>	54		51		
Speichelflussrate					
<i>Codierung</i>	> 1,7 ml/min	1,1 – 1,7 ml/min		< 1,1 ml/min	
<i>N</i>	18	57		30	
Pufferkapazität					
<i>Codierung</i>	niedrig	mittel		hoch	
<i>N</i>	4	27		74	

Tabelle 3: Zusammenfassung der deskriptiven, klinischen Parameter

## 4.2 Korrelationen der erhobenen Parameter

Zur Betrachtung der Zusammenhänge zwischen den einzelnen erhobenen Parametern wurde eine Spearman-Rank Korrelation durchgeführt (Korrelationskoeffizient  $r$ ).

Die Korrelation wurde ab  $p < 0,05$  als signifikant und ab  $p < 0,01$  als hoch signifikant angesehen. Korreliert man den DMFT-Wert und den Karies-Aktivitäts-Index so zeigte

sich eine signifikant positive Korrelation zwischen diesen beiden Parametern ( $r = 0,208$ ). Ähnlich verhält sich die Korrelation zwischen dem Karies-Aktivitäts-Index und dem Kariesrisiko ( $r = 0,323$ , hoch signifikant). Dies verdeutlicht, dass Patienten mit einer großen Karieserfahrung ein deutlich erhöhtes Risiko für neue kariöse Läsionen aufweisen.

Betrachtet man die Speichelparameter, so zeigt sich eine hoch signifikante, allerdings negative, Korrelation zwischen dem DMFT-Wert [Kariesrisiko] und sowohl der Pufferkapazität des Speichels als auch der Speichelmenge ( $r = -0,261$ , [ $r = -0,253$ ];  $r = -0,361$ , [ $r = -0,374$ ]). Es bestätigte sich, dass eine geringe Pufferkapazität und eine niedrige Speichelflussrate mit einem hohen Kariesrisiko einhergingen. Analog dazu ergab sich eine weitere hoch signifikant negative Korrelation zwischen dem Karies-Aktivitäts-Index und der Pufferkapazität ( $r = -0,359$ ).

Innerhalb der Speichelparameter zeigte sich zwischen der Pufferkapazität und einerseits der Speichelmenge, andererseits dem pH-Wert, eine signifikante positive Korrelation ( $r = 0,194$ ;  $r = 0,355$ ). Dies verdeutlicht, dass eine hohe Pufferkapazität sowohl mit einem hohen Speichelfluss als auch mit einem hohen pH-Wert vergesellschaftet, vorliegt. Zudem wies der Parameter der Speichelmenge eine hoch signifikant positive Korrelation zum pH-Wert des Speichels auf ( $r = 0,271$ ).

### 4.3 AMP-Konzentrationen im Speichel

Mittels ELISA wurden die jeweiligen AMP-Konzentrationen der entnommenen Speichelproben gemessen. Die Konzentrationen der AMPs im Speichel sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

AMP	Mittelwert [ng/ml] $\pm$ SD
LL-37	2,17 $\pm$ 1,81
HBD-2	0,56 $\pm$ 0,28
HNP-1	0,33 $\pm$ 0,26
HNP-3	8,80 $\pm$ 8,17

*Tabelle 4: AMP-Konzentrationen im Speichel*

Betrachtet man die Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen der AMPs der Patienten, so zeigten sich hoch signifikante positive Korrelationen zwischen den

Werten für HNP-1 und sowohl LL-37 als auch HBD-2 ( $r = 0,297$ ;  $r = 0,728$ ) und eine signifikante positive Korrelation zwischen HNP-1 und HNP-3 ( $r = 0,241$ ). Zwischen HNP-3 und HBD-2 bestand ebenfalls eine höchst signifikante positive Korrelation ( $r = 0,401$ ). Zusätzlich wurden die AMP-Konzentrationen zum Alter der Patienten korreliert, hierbei zeigten sich hoch signifikante positive Korrelationen des Patientenalters mit der Konzentration von sowohl HBD-2 als auch HNP-1 ( $r = 0,301$ ;  $r = 0,346$ ).

#### **4.4 Mikrobiologische Auswertung**

Der mikrobiologische Teil der Auswertung umfasst die Speziesbestimmung und Stammzuordnung der isolierten Bakterien, die quantitative Erfassung der Keimzahlen sowie Korrelationen zwischen den unterschiedlichen Parametern.

##### **4.4.1 Speziesbestimmung und Stammgenotypisierung**

Insgesamt wurden 444 einzelne Keime von den Selektivmedien für *A. naeslundii*, 160 für *Strep. mutans* und 100 für *Lactobacillus spp.* isoliert. Diese 704 Keime wurden im Anschluss mittels MALDI-TOF analysiert, sodass eine bestimmte Spezieszugehörigkeit nachgewiesen werden konnte. Die Analyse ergab, dass 105 Keime der Spezies *Strep. mutans*, 206 *A. naeslundii* und 84 *Lactobacillus spp.* zugehörig waren.

Nach einer Genotypisierung mittels AP-PCR, anschließender Elektrophorese und Auswertung mittels UPGMA-Clusteranalyse (Dice-Koeffizient 95%) ergaben sich für *A. naeslundii* 47, für *Strep. mutans* 8 und für *Lactobacillus spp.* 30 genetisch unterschiedliche Bakterienstämme. Alle folgenden Versuche wurden mit diesen 85 Stämmen durchgeführt.

##### **4.4.2 Bestimmung der Keimzahlen**

Der Mittelwert der koloniebildenden Einheiten von allen Keimen pro Patient (CFU) lag bei  $5,5 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6$  CFU/ml auf den Columbia-Agarplatten. Der Mittelwert der koloniebildenden Einheiten für *Strep. mutans* lag bei  $3,7 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^6$  CFU/ml und für *Lactobacillus spp.* bei  $1,2 \times 10^4 \pm 7,4 \times 10^4$  CFU/ml. Die CFU-Werte von den Platten mit dem Selektivmedium für *A. naeslundii* sind weniger aussagekräftig, da die

Speziesbestimmung der von diesen Platten isolierten Keime nur in ca. 50% die Spezies *A. naeslundii* bestätigte.

#### 4.4.3 Korrelationsanalysen zwischen den einzelnen Parametern

Aufgrund der Annahme, dass die Zusammenhänge zwischen den Koloniezahlen und der klinischen Patientendaten nicht streng linear sind, wurden sämtliche Korrelationen mit dem Spearman-Rank-Korrelationskoeffizient ausgewertet. Ab einer zweiseitigen Signifikanz von  $p < 0,05$  wurde das Ergebnis als signifikant, bei  $p < 0,01$  als hoch signifikant betrachtet.

Es zeigte sich eine hoch signifikant positive Korrelation zwischen den Keimzahlen von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* ( $r = 0,353$ ).

Bei der Betrachtung der Keimzahlen im Vergleich zu den Kariesrisiko-Indizes, zeigte sich für die Zahl der Laktobazillen sowohl zum DMFT-Wert, als auch zum Karies-Aktivitäts-Index eine höchst signifikante positive Korrelation ( $r = 0,286$ ;  $r = 0,295$ ), was den großen Einfluss dieser Bakterienspezies auf das Kariesgeschehen bestätigt. Für die Keimzahlen von *Strep. mutans* zeigte sich keine signifikante Korrelation zum DMFT-Wert, jedoch eine schwach signifikante Korrelation zum Karies-Aktivitäts-Index ( $p = 0,074$ ,  $r = 0,175$ ). Eine signifikant positive Korrelation zeigte sich zwischen der Keimzahl der Laktobazillen und dem Kariesrisiko ( $r = 0,246$ ), wohin die Korrelation zwischen der Keimzahl von *Strep. mutans* und dem Kariesrisiko eine schwach signifikante Korrelation ergab ( $p = 0,082$ ,  $r = 0,171$ ). Zwischen den Keimzahlen der Laktobazillen und der Pufferkapazität des Speichels spiegelte sich eine höchst signifikante negative Korrelation wieder ( $r = -0,281$ ). Dies zeigt, je niedriger die Pufferkapazität der Patienten war, desto höher war die Anzahl der gewachsenen Keimzahlen der Laktobazillen. Im Umkehrschluss lag bei einer hohen Pufferkapazität eine niedrige Keimzahl vor. Ein ähnliches Verhalten zeigte die Korrelation sowohl zwischen der Keimzahl der Laktobazillen und der gemessenen Speichelmenge als auch der Keimzahl und dem pH-Wert des Speichels. Diese stellten sich als signifikant negative Korrelationen dar ( $r = -0,197$ ;  $r = -0,209$ ). Diese Korrelationen zeigen, dass eine niedrige Speichelmenge und ein niedriger pH-Wert mit hohen Keimzahlen von Laktobazillen einhergingen.

Bezüglich der mikrobiologischen Daten zeigte sich im Hinblick auf die Gesamtkeimzahl sowohl eine signifikante positive Korrelation zwischen dieser und der Konzentration von LL-37 ( $r = 0,213$ , signifikant), als auch von HBD-2 ( $r = 0,259$ , hoch signifikant). Interessanterweise zeigte sich eine negative signifikante Korrelation zwischen der Konzentration von HNP-3 und der Keimzahl von Mutans-Streptokokken ( $r = -0,196$ ).

Zudem zeigte sich eine positive signifikante Korrelation zwischen dem Kariesrisiko und der Konzentration an HBD-2 ( $r = 0,195$ ). Ebenfalls konnte eine hoch signifikante positive Korrelation für das Kariesrisiko und der HNP-1-Konzentration nachgewiesen werden ( $r = 0,270$ ).

#### 4.4.4 Sensibilitätsprüfung der Bakterienstämme gegenüber AMPs

Die deskriptive Darstellung der Bakterienreduktion abhängig von Keim, Konzentration und AMP ist in Abbildung 43 dargestellt.

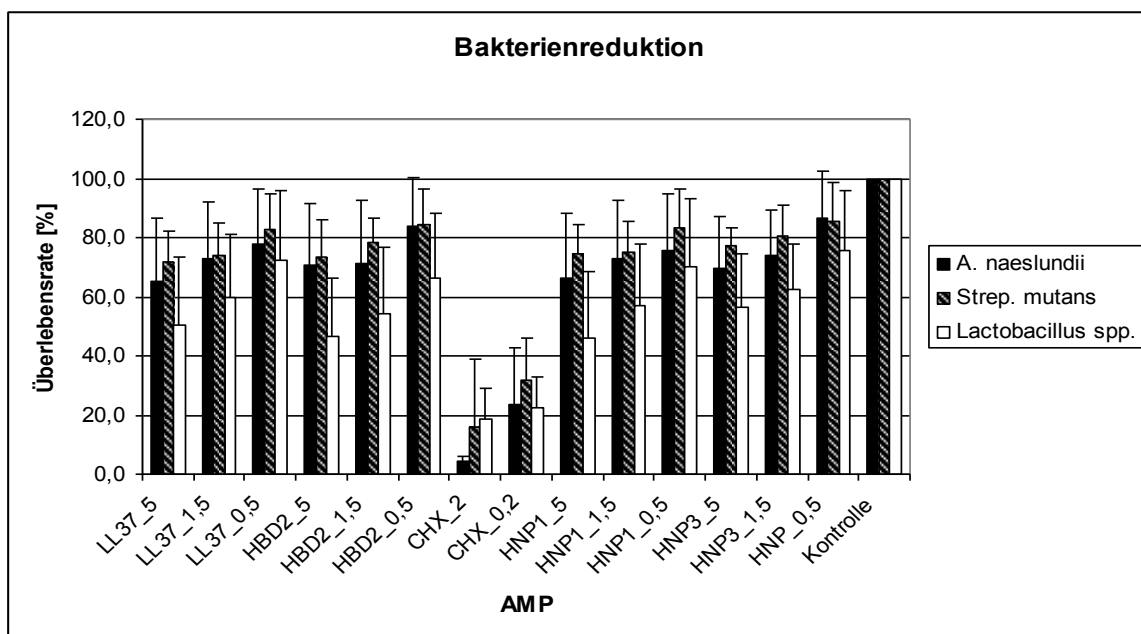


Abbildung 43: Bakterienreduktion abhängig von Keim, AMP und Konzentration

Generell zeigte sich mittels der univariaten Varianzanalyse (ANOVA,  $\alpha$ -Level 0,05), dass bei allen Keimen eine höhere Keimreduktion stattgefunden hatte, je höher die AMP-Konzentration war.

Sowohl die Art des AMPs (LL-37, HBD-2, HNP-1, HNP-3), als auch die verschiedenen Konzentrationen (5 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,5 mg/ml), übten einen Einfluss

auf die Reduktion von *Lactobacillus spp.* aus ( $p = 0,029$ ,  $\eta^2 = 0,026$ ;  $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,147$ ). Die Post-Hoc-Analyse mittels LSD-Test zeigte, dass bei diesem Keim sowohl HBD-2, als auch HNP-1 eine signifikant bessere Bakterienreduktion als HNP-3 aufwies ( $p = 0,005$ ;  $p = 0,028$ , siehe Abbildung 44). Bei genauerer Betrachtung, mit Inklusion der Konzentrationen, gilt dies insbesondere für HBD-2 (5 mg/ml), zu allen Konzentrationen von HNP-3 ( $p = 0,076$ ;  $p = 0,004$ ;  $p < 0,0001$ ) und für HNP-1 (5 mg/ml) zu allen Konzentrationen von HNP-3 ( $p = 0,068$ ;  $p = 0,003$ ;  $p < 0,0001$ ).

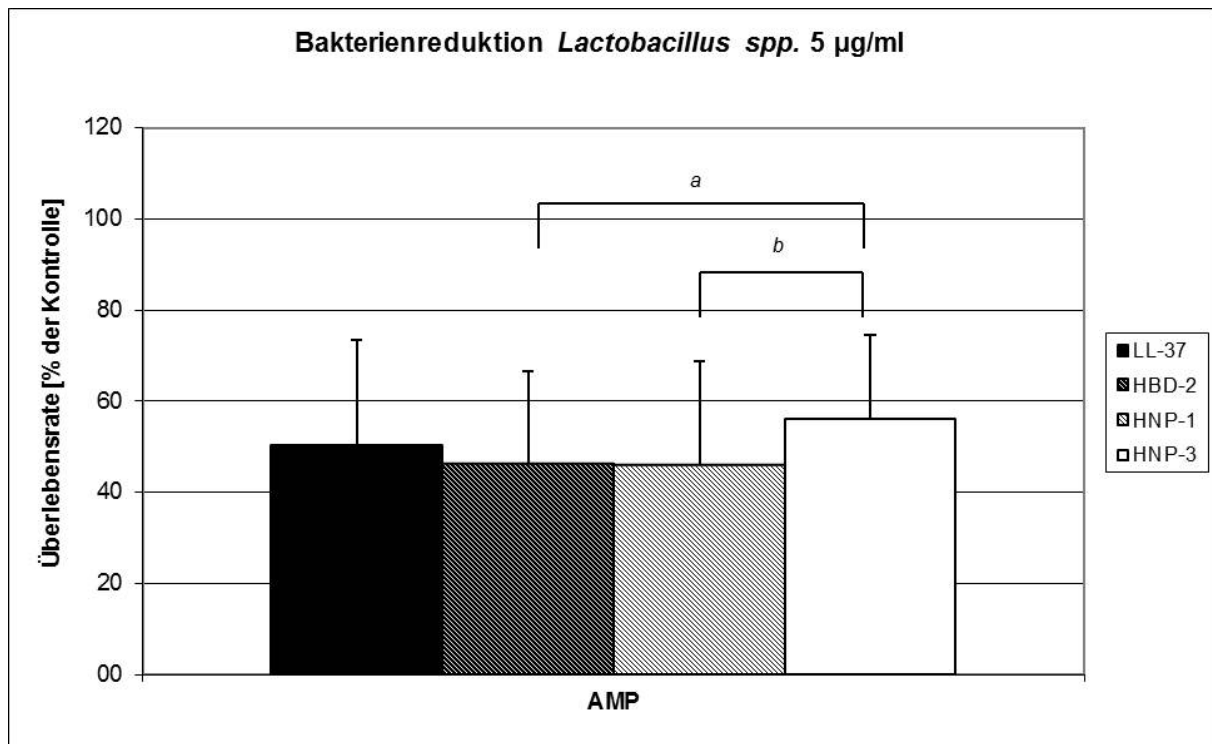


Abbildung 44: Signifikante Unterschiede der Bakterienreduktion bei *Lactobacillus spp.* für verschiedene AMPs, Post-hoc-LSD-Test (<sup>a</sup>  $p = 0,005$ ; <sup>b</sup>  $p = 0,028$ )

Im Gegensatz dazu zeigten sich für die Keime *Strep. mutans* und *A. naeslundii* keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Keimreduktion für die AMPs bei den Post-Hoc Tests. Ebenfalls zeigten sich bei *Strep. mutans* keine signifikanten Ergebnisse bei Betrachtung der unterschiedlichen Kombinationen von AMP und Konzentration. Die Betrachtung dieser Kombinationen bei *Lactobacillus spp.* zeigte allerdings einen höchst signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion ( $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,167$ ). Der LSD Post-Hoc-Test für die Kombination von LL-37 mit 5 mg/ml zeigte signifikant besser Reduktionsraten als HNP-3 mit 1,5 mg/ml ( $p = 0,030$ ). Die Univariate Varianzanalyse für die Kombinationen bei *A. naeslundii* zeigte einen höchst signifikanten Einfluss auf die Bakterienreduktion ( $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,094$ ). LL-37 mit

0,5 mg/ml übt eine größere Bakterienreduktion als HNP-3 (0,5 mg/ml;  $p = 0,029$ ). HNP-1 (0,5 mg/ml) übt bei *A. naeslundii* ebenfalls eine größere Bakterienreduktion sowohl gegenüber HBD-2 (0,5 mg/ml) als auch HNP-3 (0,5 mg/ml) aus ( $p = 0,034$ ;  $p = 0,006$ ).

Unter Einbeziehung aller Parameter (Keim, AMP, Konzentration) ergab die Post-Hoc-Analyse eine signifikant bessere Bakterienreduktion für LL-37 und HNP-1 mit den Konzentrationen 5 mg/ml und 1,5 mg/ml für *Lactobacillus spp.* als für *A. naeslundii* ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,005$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ). HBD-2 und HNP-3 zeigten für alle drei Konzentrationen (5 mg/ml; 1,5 mg/ml; 0,5 mg/ml) eine signifikant bessere Reduktion bei *Lactobacillus spp.* als bei *A. naeslundii* ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,003$ ;  $p = 0,012$ ;  $p = 0,017$ ) (siehe Abbildung 45).

Ebenfalls zeigte die Analyse, dass bei LL-37 (5 mg/ml) eine deutlich höhere Bakterienreduktion bei *Lactobacillus spp.* als bei *Strep. mutans* stattfand ( $p = 0,006$ ). Alle drei Konzentrationen des AMPs HBD-2 zeigten eine signifikant bessere Reduktion der Laktobazillen als der Mutans-Streptokokken ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,002$ ;  $p = 0,021$ ). HNP-1 und HNP-3 (5 mg/ml; 1,5 mg/ml) übten ebenfalls eine signifikant höhere Bakterienreduktion auf *Lactobacillus spp.* als auf *Strep. mutans* aus ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,022$ ;  $p = 0,007$ ;  $p = 0,023$ ).

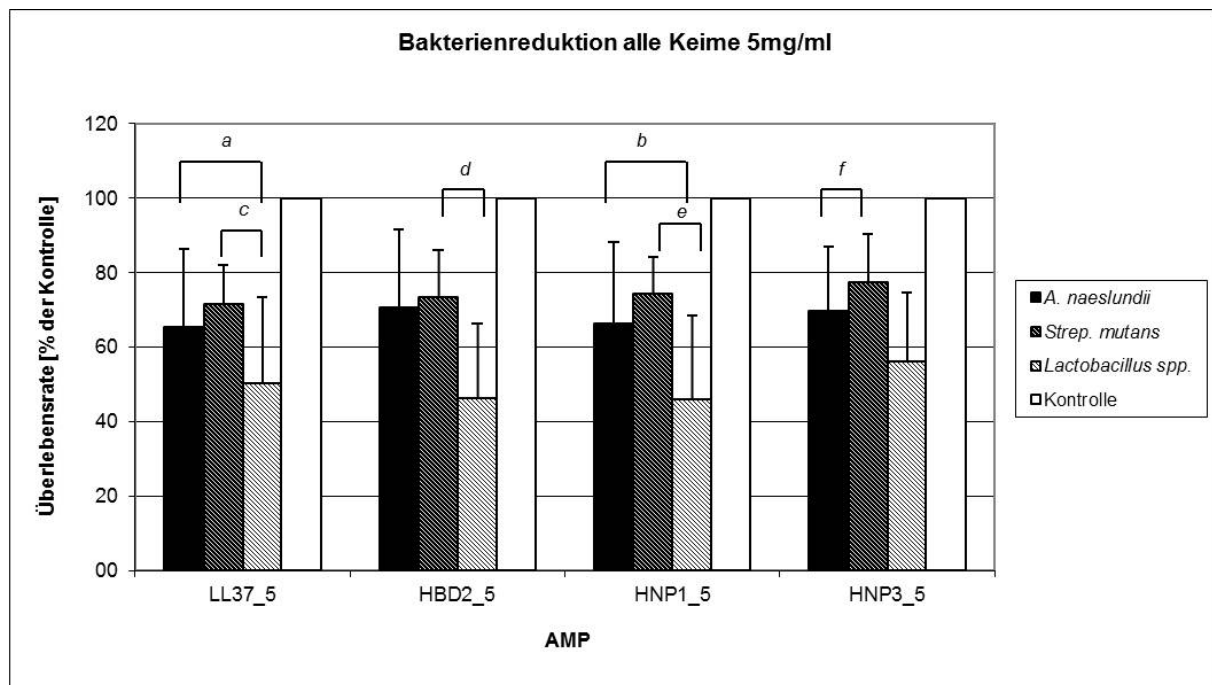


Abbildung 45: Signifikante Unterschiede der Bakterienreduktion aller Keime abhängig von den AMPs, Post-Hoc-LSD-Test ( <sup>a</sup>  $p < 0.0001$ ; <sup>b</sup>  $p < 0.0001$ ; <sup>c</sup>  $p = 0.006$ ; <sup>d</sup>  $p = 0.001$ ; <sup>e</sup>  $p < 0.0001$ ; <sup>f</sup>  $p = 0.007$ )

#### 4.4.5 Risikostratifizierung der Bakterienstämme

Die Risikostratifizierung der isolierten Bakterienstämme, beruhend auf dem unterschiedlichen Ansprechen der Stämme auf die AMPs, ist aus Tabelle 5 ersichtlich.

Keim	Hohes Risiko	Mittleres Risiko	Niedriges Risiko
<i>A. naeslundii</i>	17	18	12
<i>Strep. mutans</i>	2	4	2
<i>Lactobacillus spp.</i>	6	15	9

Tabelle 5: Risikostratifizierung der Bakterienstämme

#### 4.4.6 Mikrobiologische Risikostratifizierung der Patienten

Hinsichtlich des individuellen mikrobiologischen Risikos für den Patienten ergab sich ausgehend von der Anzahl der auftretenden Hochrisikostämme folgendes Ergebnis (Tabelle 6).



	<b>N (Patienten)</b> <b>Alle Keime</b>	<b>N (Patienten)</b> <b><i>Strep. mutans</i></b>	<b>N (Patienten)</b> <b><i>Lactobacillus spp.</i></b>
<b>Hohes Risiko</b>	21	16	6
<b>Mittleres Risiko</b>	67	30	15
<b>Niedriges Risiko</b>	17	59	84

*Tabelle 6: Risikostratifizierung der einzelnen Patienten hinsichtlich verschiedener Spezies*

Es zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem mikrobiologischen Risiko und einerseits dem Kariesrisiko und andererseits den AMP-Konzentrationen. Auffällig war eine signifikante positive Korrelation des Karies-Aktivitäts-Index und dem mikrobiologischen Risiko für *Strep. Mutans* ( $r = 0,225$ ), welche den Zusammenhang zwischen aggressiven Bakterienstämmen und aktiven Kariesläsionen darstellt. Des Weiteren zeigte sich eine positive signifikante Korrelation zwischen dem DMFT-Index und dem individuellen Risiko der Laktobazillen ( $r = 0,211$ ). Eine negative signifikante Korrelation zeigte sich zwischen der Konzentration von HNP-3 und dem Laktobazillen-Risiko ( $r = -0,247$ ).

## 5 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Isolierung und Testung von kariespathogenen Keimen gegenüber unterschiedlichen AMPs. Mit diesen Ergebnissen sollte eine Korrelation zum Kariesrisiko der Patienten hergestellt werden, um mögliche Risikofaktoren hinsichtlich des Bakterienspektrums herauszufinden.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine relativ heterogene Altersverteilung des Patientenguts, was aus der Rekrutierungspraxis über eine allgemeine Schmerzambulanz und aus den studentischen Kursen der klinischen Ausbildung an der Zahnklinik resultierte. Es konnten durch die Untersuchung von 105 Probanden aussagekräftige Schlüsse gezogen werden. Das gewählte Patientenkollektiv entspricht einer typischen Situation von Patienten mit guter Mundhygiene in einer mitteleuropäischen Großstadt dar. Der Durchschnitt putzte sich mindestens zwei Mal am Tag die Zähne, verwendete fluoridhaltige Zahnpasta und führte teilweise weitere Fluoridierungsmaßnahmen durch. 54% des Patientenguts gaben an, mindestens einmal oder mehrmals täglich Zahnseide zu verwenden, 37% mindestens 2-3 Mal die Woche. Ein Drittel der 105 Patienten hatte bereits eine Parodontitis-Behandlung in der Vergangenheit, ein Viertel der Probanden wies behandlungsbedürftige Parodontalverhältnisse auf.

Die Einschlusskriterien führten zu einem Patientenkollektiv, in dem eine gleichmäßige Verteilung des Kariesrisikos zu beobachten war (DMFT-Wert  $11,4 \pm 8,7$ ). Innerhalb des Patientenspektrums war eine deutliche Divergenz des Kariesbefalls festzustellen, was sich anhand der Verteilung des Kariesrisikos zeigte (vgl. Abbildung 35 Kariesrisiko). Der DMFT-Index stellt eine besonders gute Verknüpfung zwischen vergangenen und zukünftigen Kariesläsionen dar und ist somit ein aussagekräftiger Faktor zur Analyse des individuellen Kariesrisikos (Russell *et al.*, 1990). Um eine genauere Einteilung der Werte vornehmen zu können, wurde ein Risikoprofil für die Kariesanalyse anhand der errechneten DMFT-Werte erstellt. Die Einteilung wurde wie folgt vorgenommen: ein niedriges Risiko bestand bei einem DMFT von 0-4, ein mittleres Risiko bei Werten von 5-8 und ein hohes Kariesrisiko bei einem DMFT-Wert  $> 8$ . Die Ergebnisse zeigten, dass über die Hälfte ein hohes Kariesrisikoprofil aufgewiesen hat. Unsere Auswertung bestätigte die Ergebnisse hinsichtlich der

Zahnverluste, analog zu den Untersuchungen der DMS IV. Zusätzlich wurde die Anzahl der aktiven kariösen Läsionen bestimmt, um eine Aussage über das aktuelle Kariesgeschehen treffen zu können. In etwa die Hälfte der Patienten wiesen zu dem Untersuchungszeitpunkt aktive kariöse Läsionen auf.

Ein weiterer Outcome-Parameter waren verschiedene Untersuchungen bezüglich des Speichels der Probanden, anhand dessen pH-Wert, Speichelmenge ( $7,47 \pm 0,49$ ;  $1,44 \pm 0,6$  ml/min) und Puffer-Kapazität gemessen wurden. Eine Studie aus dem Jahr 2010 ergab, dass es keinen Zusammenhang zwischen diesen Parametern und dem Kariesrisiko gab (Martínez-Pabón *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem DMFT-Wert (ANOVA mit Chi-Square-Test  $p < 0,0001$ ) (Farsi, 2008). Unsere Ergebnisse bestätigten zusätzlich jeweils hoch signifikante negative Korrelation zwischen der Pufferkapazität des Speichels und der Speichelflussrate ( $r = -0,261$ ;  $r = -0,361$ ). Zusätzlich zeigte sich zwischen der Pufferkapazität und der Speichelmenge eine signifikant positive Korrelation ( $r = 0,194$ ). Dies wurde ebenfalls in einer anderen Studie bestätigt, wo eine positive signifikante Korrelation ( $r = 0,51 - 0,60$ ,  $p < 0,001$ ) dieser beiden Parameter bei Mädchen und Jungen im Alter von 11 Jahren bestimmt wurde. Weiterhin belegt diese Studie einen hoch signifikanten inversen Zusammenhang zwischen dem Kariesindex und sowohl der Speichelflussrate als auch der Pufferkapazität ( $p < 0,0001$ ) (Tukia-Kulmala und Tenovu, 1993). Diese Daten belegen, dass es aktuell keine einheitliche Studienlage hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen dem pH-Wert, der Speichelflussrate, der Pufferkapazität und dem Kariesbefall gibt. Eine höhere Pufferkapazität ist in der Lage, eine größere Menge an Säuren zu neutralisieren und trägt damit zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes bei. Ähnliches gilt für die Speichelflussrate, die bei höheren Werten eine höhere Clearance ermöglicht. Somit sind alle drei Parameter in der Entwicklung von kariösen Läsionen beteiligt. Unsere Ergebnisse verdeutlichen einen statistisch signifikanten Einfluss all dieser Faktoren auf das Kariesgeschehen.

Bezüglich der mikrobiologischen Auswertung muss generell festgestellt werden, dass das Probenmaterial in dieser Studie Plaque von Kariesprädispositionsstellen war. Da in dieser Studie keine Intervention erfolgte und auch gesunde Patienten mit

eingeschlossen werden sollten, fand keine zusätzliche Probenentnahme aus eröffneten kariösen Läsionen statt.

Hinsichtlich der Betrachtung der Keimzahlen haben wir in unserer Studie festgestellt, dass es im gesamten Patientengut zu sehr großen Differenzen kam. Dies lässt sich auf die bereits erwähnten großen Unterschiede im Bezug auf die Kariesaktivität sowie auf die unterschiedliche Plaquesituation zurückführen. Es zeigte sich eine hoch signifikant positive Korrelation zwischen den Keimzahlen von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* ( $r = 0,353$ ), was auf einen synergistischen Effekt dieser beiden Spezies hindeutet. Ein möglicher Grund dafür ist ein niedriger pH-Wert, welcher für beide Spezies optimale Wachstumsbedingungen darstellt (Harper *et al.*, 1983).

Weiterhin ergab die Betrachtung der Keimzahlen im Bezug auf das Kariesrisiko, dass die Anzahl der Laktobazillen sowohl zum DMFT-Wert als auch zum Karies-Aktivitäts-Index eine höchst signifikante positive Korrelation aufwiesen ( $r = 0,286$  und  $r = 0,295$ ). Dies stützt die Ergebnisse von Munson und Mitarbeiter aus dem Jahr 2004, nach denen die Gattung *Lactobacillus spp.* die dominante Spezies in kariösen Läsionen darstellt (Munson *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Keimzahl von *Strep. mutans* und dem DMFT-Wert, jedoch war sie schwach signifikant positiv zwischen der Anzahl dieser Spezies und dem Kariesrisiko ( $p = 0,082$ ,  $r = 0,171$ ). Dies legt den Schluss nahe, dass das Auftreten von *Strep. mutans* mit dem Vorhandensein von aktiven kariösen Läsionen einhergeht. Andererseits belegt eine andere Studie einen signifikanten Zusammenhang dieser beiden Parameter ( $p = 0,04$ ) (Phattarataratip *et al.*, 2011). Dies wurde ebenso von Al Shukairy und Mitarbeitern bei der Untersuchung von Kindern mit frühkindlicher Karies festgestellt (Al Shukairy *et al.*, 2006). Die von uns bestimmten Keimzahlen von den CFAT-Platten, welche *A. naeslundii* repräsentieren, eigneten sich nicht zur statistischen Auswertung, da die MALDI-TOF-Analyse dieser Keime nur in ca. 50% ein zutreffendes Ergebnis ergab.

Weiterhin wurde als wichtiger Parameter in dieser Studie die Konzentration von verschiedenen AMPs im Speichel gemessen. Dies erfolgte mittels eines für das AMP spezifischen enzymgekoppelten Immunoassays (ELISA). Erstmals erfolgte eine

separate Betrachtung der Konzentrationen von HNP-1 und HNP-3, durch die Verfügbarkeit von spezifischen ELISA-Kits.

Durch das breite Patientenspektrum konnten für bestimmte AMPs durchschnittliche Speichelkonzentrationen der Probanden angegeben werden. Zieht man das Patientenalter in Betracht, zeigte sich jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Alter und sowohl der Konzentration von HBD-2 als auch von HNP-1 ( $r = 0,301$ ;  $r = 0,346$ ).

Der Mittelwert für LL-37 lag bei  $2,17 \pm 1,81$  ng/ml, für HBD-2 bei  $0,56 \pm 0,28$  ng/ml, für HNP-1 bei  $0,33 \pm 0,26$  ng/ml und für HNP-3 bei  $8,8 \pm 8,17$  ng/ml. Die Bestimmung des Mittelwerts erfolgte unabhängig des Infektionsstatus des Patienten sowohl in Bezug auf Karies als auch Parodontitis. Eine ähnliche Studie zur Untersuchung der AMP-Speichelkonzentrationen ergab für LL-37  $15,81 \pm 10,43$  ng/ml, für HBD-2  $0,734 \pm 0,811$  ng/ml und für HNP-1-3  $1,913 \pm 1,157$  ng/ml (Phattaratatip *et al.*, 2011). Dabei ist zu beachten, dass auch diese Messungen mittels ELISA durchgeführt wurden, zu dem Zeitpunkt der Studie allerdings nur ein ELISA für HNP-1 und -3 zusammen existierte. Somit ist dieser Wert mit unseren Werten nicht vergleichbar, jedoch wurden ähnliche Konzentrationen für HBD-2 ermittelt. Ferraz de Brito Penna Forte und Mitarbeiter nahmen eine Unterteilung in ihrer Studie zwischen stressfreien und Patienten in aktueller Stresssituation vor. Die Ergebnisse zeigten, dass stressfreie Patienten eine HBD-2-Konzentration von  $0,242 \pm 0,144$  ng/ml und Patienten mit Stress von  $0,210 \pm 0,115$  ng/ml erreichten (Ferraz de Brito Penna Forte *et al.*, 2010). Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Gruppen war allerdings nicht signifikant. Die Konzentrationen bewegten sich jedoch in einem ähnlichen Spektrum, wie die von uns gemessenen. Eine weitere Studie nahm ebenfalls eine Messung der AMP-Konzentration vor, wobei die Ergebnisse zur Proteinkonzentration im Speichel normalisiert wurden. Es ergab sich für HNP-1-3 eine durchschnittliche Konzentration von  $0,94$  µg/ml und für LL-37  $3,36$  µg/ml, allerdings mit sehr großen Standardabweichungen. Die um mehrere Zehnerpotenzen höheren Konzentrationen lassen sich möglicherweise mit einem völlig unterschiedlichen Nachweisverfahren, beruhend auf dem Verfahren der Flüssigkeitschromatographie (HPLC), erklären (Mizukawa *et al.*, 1999). Außerdem belegten Studien, dass sowohl die

Speichelkonzentration von HNP1-3 als auch die von LL-37 bei kariesfreien Patienten höher waren, als bei Patienten mit aktueller Karies (Dale *et al.*, 2006).

In einer Studie aus dem Jahr 2009 wurden die Konzentrationen von LL-37 im Sulkusfluid von Patienten mit Gingivitis und chronischer Parodontitis gemessen. Die Ergebnisse zeigten deutlich höhere Werte bei Probanden mit chronischer Parodontitis (Turkoglu *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Expression von HBD-2 und HNP-1-3, könnte die Stimulation von gingivalen Fibroblasten und Epithelzellen, durch von Bakterien ausgeschüttete pro-inflammatorischen Zytokinen sein. Dies wurde in Zellkulturexperimenten bereits nachgewiesen (Liu *et al.*, 2013). Ähnliche Ansätze zeigen sich in unserer Studie für die Konzentrationen von HBD-2 und HNP-1, die signifikant positiv mit dem Kariesrisiko und damit dem Vorhandensein von pathogenen Bakterienstämmen korrelierten ( $r = 0,195$ ;  $r = 0,270$ ). Dies wurde in einer Studie aus dem Jahr 2005 widerlegt, wo sich für hohe Konzentrationen von HNP1-3 niedrigere Karieswerte widerspiegeln (Tao *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen AMP-Konzentrationen und Karieserfahrungen (Phattarataratip *et al.*, 2011).

Hinsichtlich der Gesamtkeimzahl zeigte sich in unserer Studie eine positiv signifikante Korrelation zu der Konzentration von LL-37 ( $r = 0,213$ ), zusätzlich ergab sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Gesamtkeimzahl und der Konzentration von HBD-2 ( $r = 0,259$ ). Im Gegensatz dazu korrelierte die Konzentration von HNP-3 negativ mit der Keimzahl der Mutans-Streptokokken ( $r = -0,196$ ). Dies könnte ein Erklärungsansatz für das erhöhte Kariesrisiko bei einer erhöhten Anzahl von *Strep. mutans* und erniedrigten HNP-3-Konzentrationen sein.

Das Hauptziel unserer Studie war es, die Empfindlichkeit von aus Patienten isolierten kariespathogenen Bakterienstämmen hinsichtlich unterschiedlicher AMPs und Konzentrationen dieser zu testen. Wir kamen zu der Erkenntnis, dass eine deutlich höhere Reduktionsrate bei AMP-Konzentrationen von 5 µg/ml im Vergleich zu 0,5 µg/ml, (Univariate ANOVA,  $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,147$ ) zu erkennen war. Insbesondere für die Keime der Gattung *Lactobacillus spp.* zeigte sich zusätzlich ein Einfluss der Art des AMPs auf die Reduktionsrate der Bakterien ( $p = 0,029$ ,  $\eta^2 = 0,026$ ). Die Post-Hoc-Analyse mittels LSD-Test ergab für HBD-2 als auch HNP-1 signifikant bessere

Reduktionsraten als für HNP-3 ( $p = 0,005$ ;  $p = 0,028$ ). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Bakterienreduktionen für *Strep. mutans* und *A. naeslundii* unabhängig von den verwendeten AMPs waren. Allerdings ließ sich für die Kombination aus AMP und Konzentration stets ein signifikanter Einfluss auf die Bakterienreduktion aller getesteten Spezies erkennen (Univariate Varianzanalyse). Unter Einbeziehung der Parameter Keim, AMP und Konzentration ergab sich bei *Lactobacillus spp.* eine bessere Reduktionsrate für alle AMPs als für *A. naeslundii* und *Strep. mutans*. Ebenfalls belegt eine Studie, dass HBD-3 und LL-37 die höchste Aktivität gegenüber *Strep. mutans* zeigten. Innerhalb der  $\alpha$ -Defensine zeigte *Strep. mutans* die höchste Anfälligkeit zunächst auf HNP-1, danach auf HNP-2 und HNP-3 (Phattarataratip *et al.*, 2011).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass keine eindeutige Tendenz in Richtung eines gegen alle Keime besonders wirksamen AMPs zu erkennen ist. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von Phattarataratip und Mitarbeitern, wobei die AMP-Konzentrationen einen bedeutenden Faktor hinsichtlich der Reduktionsrate darstellten. Weiterhin zeigten sie, dass die Reduktionen bei 5  $\mu\text{g/ml}$  HNP-1 ( $p = 0,01$ ) eine signifikante Korrelation zu 0,5  $\mu\text{g/ml}$  HNP-1 ( $p = 0,03$ ) bildeten (Phattarataratip *et al.*, 2011).

Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass sämtliche Studien lediglich die Wirkung auf planktonische Bakterien untersucht haben. Dies entspricht jedoch nicht den klinischen Gegebenheiten einer Biofilm-assoziierten Erkrankung wie Karies. Aus diesem Grund haben wir die Wirkung von AMPs auf Biofilmkulturen getestet. Jedoch gilt es zu beachten, dass unser Versuchsaufbau anhand eines Monospezies-Biofilmmodells durchgeführt wurde, welches natürlicherweise nicht exakt die Verhältnisse in der Mundhöhle nachahmt. Dieses Vorgehen liegt darin begründet, dass das Hauptaugenmerk in unserer Studie auf der Empfindlichkeitstestung einzelner Stämme lag.

Aufbauend auf der Hypothese, dass unterschiedliche Stämme der gleichen Spezies ein differenziertes Ansprechen gegenüber AMPs aufweisen, haben wir die mittels AP-PCR identifizierten Bakterienstämme hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit getestet. Anhand der Ergebnisse erfolgte eine Risikostratifizierung der Stämme im Hinblick auf

die Wirksamkeit der AMPs. Ausgehend von dem Mittelwert der bakteriellen Reduktion über alle Stämme einer Spezies wurden die einzelnen Stämme Risikogruppen zugeordnet. Stämme mit Reduktionsraten unter dem Mittelwert plus der halben Standardabweichung wurden als Hochrisikostämme, jene mit Reduktionsraten über dem Mittelwert minus der halben Standardabweichung als Stämme mit niedrigem Risiko eingeteilt. Durch den gebildeten Mittelwert erschienen uns diese Bereiche als sinnvoll, insbesondere da sich eine gleichmäßige Anzahl an Stämme für jede Risikogruppe ergab.

Um für den individuellen Patienten ein bakterielles Risiko angeben zu können, wurde ausgehend von den bei einem Patienten isolierten Keimen eine Risikostratifizierung erstellt. Dies erfolgte isoliert für die Gesamtheit der Keime und für *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.*. Dabei erwiesen sich ca. 25% als Hochrisikopatienten. Ergebnis dieses Prozesses war die Erstellung eines individuellen mikrobiologischen Risikos hinsichtlich der AMPs für jeden untersuchten Patienten.

Hierbei traten keine generell signifikanten Zusammenhänge zwischen dem mikrobiologischen Risiko und einerseits dem Kariesrisiko und andererseits den AMP-Konzentrationen auf. Jedoch ergab sich sowohl eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Karies-Aktivitäts-Index und dem mikrobiologischen Risiko für *Strep. mutans* ( $r = 0,225$ ) als auch zwischen dem DMFT-Index und dem individuellen Risiko für die Laktobazillen ( $r = 0,211$ ). Das bedeutet, dass Patienten mit einem aktuell aktiven kariösen Geschehen tendenziell ein Spektrum von *Strep. mutans* zeigen, die gegenüber AMPs resistenter sind. Im Hinblick auf die Kariesvergangenheit lässt sich eine ähnliche Schlussfolgerung für Keime der Gattung *Lactobacillus spp.* ziehen.

Phattarataratip und Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, dass unterschiedliche Stämme von *Strep. mutans* unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen AMPs zeigen. Diese Forschergruppe postuliert somit, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von hochpathogenen Stämmen von *Strep. mutans* und dem Kariesgeschehen gibt, ohne jedoch konkrete Zahlen zu nennen.

Unsere Studie liefert erstmals eine belastbare Korrelation zwischen klinischen und mikrobiologischen Parametern. Anscheinend besitzen bestimmte Stämme von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* natürliche Resistenzen gegenüber manchen AMPs, oder



sind in der Lage diese zu entwickeln. Jene Stämme hätten somit einen Selektionsvorteil gegenüber anderen, da sie vom Immunsystem des Patienten nicht adäquat bekämpft werden können. Das Auftreten von Hochrisikostämmen der Spezies *A. naeslundii* scheint keinen signifikanten Einfluss auf das Kariesgeschehen zu haben. Dies ist ein weiterer Aspekt, welcher die Pathogenität von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* hinsichtlich Karieserkrankungen demonstriert.

Hinsichtlich der zu Anfang gestellten Hypothese kann festgestellt werden, dass diese in weiten Teilen akzeptiert werden kann. Es wurden, wie vermutet, signifikante Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von gegenüber AMPs wenig empfindlichen Bakterienstämmen und dem klinischen Kariesstatus gefunden. So zeigte sich sowohl für *Lactobacillus spp.* und *Strep. mutans* ein solcher Zusammenhang in Bezug auf den Karies-Aktivitäts-Index und den DMFT.

Zieht man all diese Gesichtspunkte in Betracht, könnte die unterschiedliche Resistenzlage des Bakterienspektrums eines Patienten ein Ansatzpunkt sein unterschiedliche Ausprägungen von Karieserkrankungen trotz eines auf Speziesebene ähnlichen Spektrums, zu erklären.

Diese Ergebnisse können somit einen ersten Schritt zur Verbesserung in der Kariesdiagnostik darstellen. So ist zum Beispiel ein Screening-Test auf besonders resistente Bakterien gegenüber AMPs denkbar. Damit könnten Patienten mit einem höheren, unbeeinflussbarem, Kariesrisiko identifiziert werden und beispielsweise in ein engmaschigeres Recall-Programm aufgenommen werden. Sollten sich nun einige AMPs in weiteren Studien als besonders wirksam erweisen, wäre ein therapeutischer Einsatz als adjuvante Kariestherapie denkbar.

## 6            **Ausblick**

Durch die Ergebnisse dieser Studie ist eine Verwendung von mikrobiologischen Risikoprofilen zur Bestimmung des Kariesrisikos denkbar. Auch wenn die Erkennung der Hochrisikostämme mit derzeitigen Methoden aufwändig ist, könnte doch ein diagnostischer Mehrwert dadurch erzielt werden. Möglich sind beispielsweise Verfahren, die auf dem Nachweis der DNA von hochpathogenen Bakterien beruhen.

Klinisch betrachtet wäre es denkbar, Hochrisikopatienten hinsichtlich Karies besser zu identifizieren und in ein engmaschiges Recall-Regime einzubinden, um frühzeitig die Entwicklung von neuen kariösen Läsionen zu erkennen. In diesem Stadium wäre möglicherweise sogar noch eine nicht- bzw. minimal-invasive Therapie möglich.

Diese Studie zeigt unter anderem auch, dass die Expression von AMPs im Speichel eine Rolle in der Abwehr oralpathogener Bakterien spielt. Diese Erkenntnis legt den Schluss nahe, dass sich AMPs als iatrogen eingebrachte antimikrobielle Substanzen eignen würden. Denkbar wäre beispielsweise der Zusatz von AMPs zu Produkten, die zur Fluoridierung verwendet werden. Durch ihre Eigenschaften als endogene Substanzen ist mit einer exzellenten Verträglichkeit zu rechnen, da es zu keiner Immunreaktion des Körpers gegen AMPs kommen würde. Auch an der Schnittstelle zur Medizin und hier insbesondere im Bereich der Dermatologie, ist eine rege Forschungstätigkeit auf dem Gebiet der AMPs zu beobachten. Diese Entwicklung wird in der Zukunft möglicherweise einen großen Anteil am Verständnis von Erkrankungen und damit zu einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten für den Patienten führen.

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von hoch pathogenen Stämmen im Hinblick auf die Resistenzlage gegenüber AMPs und der Karieserkrankung des Patienten. Zusätzlich wurde der Einfluss von verschiedenen Speichelparametern, unter anderem die Konzentration von verschiedenen AMPs auf das Kariesgeschehen untersucht.

Hierbei wurden aus Patienten isolierte kariespathogene Bakterien isoliert, quantifiziert und mittels eines Biofilmmodells hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den AMPs LL-37, HBD-2, HNP-1 und HNP-3 getestet. Dies lieferte verschiedene Risikogruppen von Bakterienstämmen, deren Auftreten einzelnen Patienten zugeordnet werden konnte. Weiterhin wurden, neben einer ausführlichen klinischen Untersuchung des Patienten, in einer Speichelprobe die Konzentration der oben genannten AMPs gemessen sowie die Speichelmenge, der pH-Wert und die Pufferkapazität gemessen.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass das Auftreten von Bakterienstämmen die gegen AMPs resistenter sind, tendenziell mit einem höheren Kariesrisiko des betroffenen Patienten einhergeht. Dabei hat sich das Verhalten von *Strep. mutans* und *Lactobacillus spp.* als besonders relevant für das Kariesgeschehen erwiesen. Das Vorhandensein von 2 bestimmten Stämmen von *Strep. mutans* und 6 Stämmen von *Lactobacillus spp.*, die sich als besonders resistent gegenüber AMPs erwiesen haben, korrelierten mit einem erhöhten Kariesrisiko. Somit ist das Auftreten dieser Stämme als Risikofaktor der Kariesentstehung zu betrachten.

Im Bereich der Speichelparameter zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen der Menge und dem pH-Wert des Speichels und dem DMFT-Index. Eine weitere interessante Korrelation wurde für die Pufferkapazität und die Konzentration von HBD-2 und HNP-1 gefunden. Dies unterstreicht die Abhängigkeit der Integrität und damit Aktivität der AMPs von den chemisch-physikalischen Bedingungen der Umgebung.

Im Rahmen einer klinischen Kariesrisiko-Analyse sind all dies zusätzliche Parameter, die es zu berücksichtigen gilt. Weitere klinische Studien werden in der Zukunft nötig

sein, um die Spezifität und Sensitivität dieser Parameter hinsichtlich der Erkrankung zu untersuchen.

Zusammenfassend leistet diese Studie einen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktionen des körpereigenen Immunsystems gegen oralpathogene Bakterien. Jedoch sind weiterführende Studien nötig, um einen detaillierteren Einblick in die Wirkungsmechanismen von AMPs, insbesondere auf zellulärer Ebene, erhalten zu können.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ und Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46: 1407-1417.
2. Abiko Y, Nishimura M und Kaku T. Defensins in saliva and the salivary glands. *Med Electron Microsc*, **2003**; 36: 247-252.
3. Agawa Y, Lee S, Ono S, Aoyagi H, Ohno M, Taniguchi T, Anzai K und Kirino Y. Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *J Biol Chem*, **1991**; 266: 20218-20222.
4. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG und Gudmundsson GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1995**; 92: 195-199.
5. Al Shukairy H, Alamoudi N, Farsi N, Al Mushayt A und Masoud I. A comparative study of Streptococcus mutans and lactobacilli in mothers and children with severe early childhood caries (SECC) versus a caries free group of children and their corresponding mothers. *J Clin Pediatr Dent*, **2006**; 31: 80-85.
6. Altman H, Steinberg D, Porat Y, Mor A, Fridman D, Friedman M und Bachrach G. In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**; 58: 198-201.
7. Arastéh K und Baenkler HW. Duale Reihe Innere Medizin. Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, **2009**.
8. Archibald LK und Gaynes RP. Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons. *Infect Dis Clin North Am*, **1997**; 11: 245-255.
9. Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, **2000**; 1: 141-150.
10. Bals R und Wilson JM. Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci*, **2003**; 60: 711-720.
11. Bauer F, Schweimer K, Klüver E, Conejo-Garcia JR, Forssmann WG, Rösch P, Adermann K und Sticht H. Structure determination of human and murine beta-defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. *Protein Sci*, **2001**; 10: 2470-2479.

12. Bibby BG und Mundorff SA. Enamel demineralisation by snack foods. *J Dent Res*, **1975**; 54: 461-470.
13. Birkhed D und Heintze U. Salivary secretion rate, buffer capacity and pH. In: Human saliva: clinical chemistry and microbiology. **1998**; CRC Press, Boca Raton: 25-73.
14. Björn H und Carlsson J. Observations on a dental plaque morphogenesis. *Odont Revy*, **1964**; 15: 23-28.
15. Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG und Hancock RE. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**; 49: 1727-1732.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**; 72: 248-254.
17. Christensen B, Fink J, Merrifield RB und Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**; 85: 5072-5076.
18. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ und Paster BJ. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43: 5753-5759.
19. Dale BA und Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. in: Gallo RL (Herausgeber): Antimicrobial peptides in human health and disease. **2004**; Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom; 223-251.
20. Dale BA, Tao R, Kimball JR und Jurevic RJ. Oral Antimicrobial Peptides and Biological Control of Caries. *BMC Oral Health*, **2006**; 6:1-13.
21. Dale BA und Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol*, **2005**; 7: 119-133.
22. Daniels TE, Silverman S Jr, Michalski JP, Greenspan JS, Sylvester RA und Talal N. The oral component of Sjögren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **1975**; 39: 875-885.
23. Davidopoulou S, Diza E, Sakellari D, Menexes G und Kalfas S. Salivary concentration of free LL-37 in edentulism, chronic periodontitis and healthy periodontium. *Arch Oral Biol*, **2013**; 58: 930-934.

24. DeGrado WF, Musso GF, Lieber M, Kaiser ET und K'ezdy FJ. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophys J*, **1982**; 37: 329-338.
25. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A und Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, **2010**; 192: 5002-5017.
26. Ellwood DC, Hunter JR und Longyear VMC. Growth of *Streptococcus mutans* in a chemostat. *Arch Oral Biol*, **1974**; 19: 659-664.
27. Evans RC und Holmes CJ, Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother*, **1987**; 31: 889-894.
28. Farsi N. Dental caries in relation to salivary factors in saudi popluation groups. *J Contemp Dent Pract*, **2008**; 9: 16-23.
29. Ferraz de Brito Penna Forte L, Cortelli SC, Cortelli JR, Aquino DR, Costa de Campos MV, Cogo K, Costa FO und Franco GCN. Psychological stress has no association with salivary levels of b-defensin 2 and b-defensin 3. *Oral Pathol Med*, **2010**; 39: 765-769.
30. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Liden S, Stahle- Backdahl M und Liden S. The expression of the gene coding tor the antimicrobial peptid LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem*, **1997**; 272:15258-15263.
31. Ganz und Lehrer **1995**. Defensins. *Pharmacol Ther*, **1995**; 66: 191-205.
32. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF und Lehrer RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, **1985**; 76: 1427-1435.
33. Giwercman B, Jensen ET, Høiby N, Kharazmi A und Costerton JW. Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, **1991**; 35: 1008-1010.
34. Goto T, Nakame Y, Nishida M und Ohi Y. Bacterial biofilms and catheters in experimental urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents*, **1999**; 11: 227-231.
35. Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE und Krasse B. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand*, **1954**; 11: 232-264.

36. Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB und Tack BF. Susceptibility of Oral Bacteria and Yeast to Mammalian Cathelicidins. *Antimicrob Agents chemother*, **2001**; 45: 3216-3219.
37. Gristina A.G. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*, **1987**; 8: 423–426.
38. Hamilton IR: Intracellular polysaccharide synthesis by cariogenic microorganisms; in Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC (Herausgeber): Proceedings: Microbial Aspects of Dental Caries (a special supplement to Microbiology Abstracts). New York, Information Retrieval, Inc, **1976**; vol 3: 683–701.
39. Hancock REW. Peptide antibiotics. *Lancet*, **1997**; 349: 418-422.
40. Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B und Schröder JM. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, **1997**; 46: 472-475.
41. Harper DS und Loesche WJ. Basic Biological Sciences: Effect of pH Upon Sucrose and Glucose Catabolism by the Various Genogroups of Streptococcus mutans. *J Dent Res*, **1983**; 62: 526-531.
42. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH und Tenovou J. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*, **2006**; 21: 326-32.
43. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 5., überarb. u. erw. Aufl., Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln, **2009**.
44. Hill CP, Yee J, Selsted ME und Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization. *Science*, **1991**; 251: 1481-1485.
45. Hogg SD. The lactic microflora of the oral cavity. In: Wood BJB (ed). The Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid bacteria in Health and Disease, vol. 1. London: Elsevier Applied Science, **1992**; 115–132.
46. Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W und Lubkowski J. Antimicrobial Characterization of Human  $\beta$ -Defensin 3 Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**; 47: 2804–2809.
47. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, Hickel R, Ilie N. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*, **2011**; 119: 204-210.



48. Jackson RJ, Lim DV und Dao ML. Identification and Analysis of a Collagenolytic Activity in *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol*, **1997**; 34: 49-54.
49. Ji S, Hyun J, Park E, Lee BL, Kim KK und Choi Y. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. *J Periodont Res*, **2007**; 42: 410-419.
50. Joly S, Maze C, McCray PB, Guthmiller Jr und Guttmiller JM. Human  $\beta$ -Defensin 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42: 1024-1029.
51. Keyes PH. Recent advances in dental caries research. Bacteriology, bacteriological findings, and biological implications. *Int Dent J*, **1962**; 12: 443-464.
52. Kneist S, Kubieziel H, Willershausen B, Küpper H und Callaway A. Modeling of *S. mutans* and *A. naeslundii* acid production in vitro with caries incidence of low- and high-risk children. *Quintessence Int*, **2012**; 43: 413-420.
53. König KG. The role of the dentist in prevention of dental disease. *Int Dent J*, **1974**; 24: 443-447.
54. König KG. Ursachen der Karies. In: Ketterl W (Hrsg.): *Zahnerhaltung I*. 3. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, **1992**; 5.
55. Larmas M. Simple tests for caries susceptibility. *Int Dent J*, **1985**; 35: 109-117.
56. Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent*, **2010**; 38: 166-171.
57. Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SSL, Ganz T und Seisted ME. Interaction of Human Defensins with *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, **1989**; 84: 553-561.
58. Licking E. Getting a grip on bacterial slime. *Business Week* 13 September, **1999**; 98-100.
59. Lie T. Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: Morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Arch Oral Biol*, **1975**; 20: 739-742.
60. Lilienthal B, Goldsworthy NE, Sullivan HR und Cameron DA. The biology of the children of Hopewood House, Bowral, New South Wales. I. Observations on dental caries extending over five years. *Med J Aust*, **1953**; 25: 878-881.

61. Liu J, Du X, Chen J, Hu L und Chen L. The induction expression of human  $\beta$ -defensins in gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol*, **2013**; 58: 1415-1421.
62. Loesche WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev*, **1986**; 50: 353-380.
63. Mah TC und O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, **2001**; 9: 34-39.
64. Maiwald HJ. Ernährung und Karies. In: Maiwald HJ (Hrsg.): Kinderzahnheilkunde, Spitta, Balingen, **1995**.
65. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res*, **2004**; 38: 204-211
66. Marsh PD und Martin VM. Dental plaque; in Marsh PD, Martin VM (eds): *Oral Microbiology*. Oxford, Wright, **1999**; 58-81.
67. Marsh PD und Nyvad B. The oral microflora and biofilms on teeth; in Fejerskov O, Kidd EAM (Herausgeber); Dental Caries. The disease and its clinical management, 2. Auflage, Blackwell Munksgaard, Oxford, **2008**; 163-187.
68. Martínez-Pabón MC, Ramírez-Puerta BS, Escobar-Paucar GM und Franco-Cortés AM. Physicochemical salivary properties, Lactobacillus, mutans streptococci counts and early childhood caries in preschool children of Colombia. *Acta Odontol Latinoam*, **2010**; 23: 249-256.
69. Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF und McCray PB. Production of  $\beta$ -Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. *Infect Immun*, **1999**; 67: 2740-2745.
70. Micheelis W und Schiffner U. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie [DMS IV]. Institut der Deutschen Zahnärzte [IDZ], Köln, **2006**.
71. Micheelis W. Oral health in Germany: an oral epidemiological outline. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, **2011**; 54: 1022-1026.
72. Miura H, Isogai E, Hirose K, Wakizaka H, Ueda I und Ito N. Application of a sucrose indicator strip to evaluate salivary sucrose clearance. *J Dent*, **1991**; 19: 189-191.

73. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S und Sugahara T. Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases. *Oral Diseases*, **1999**; 5: 139-142.
74. Munson MA, Banerjee A, Watson TF und Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42: 3023-3029.
75. Nagaoka I, Hirota S, Yomogida S, Ohwada A und Hirata M. Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflamm Res*, **2000**; 49: 73-79.
76. Neumeister B, Geiss HK, Braun R und Kimmig P. Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie – Parasitologie. Thieme, 2. Auflage, Stuttgart, **2009**.
77. Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T und Hanada N. Oral Streptococci Exhibit Diverse Susceptibility to Human  $\beta$ -Defensin-2: Antimicrobial Effects of hBD-2 on Oral Streptococci. *Curr Microbiol*, **2004**; 48: 85-87.
78. Nyvad B und Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, **1987**; 95: 369-380.
79. O'Leary TJ, Drake RB und Naylor JE. The plaque control record. *J Periodontol*, **1972**; 43: 38.
80. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc* **1955**; 50: 259-272.
81. Otlewska A, Oltuszk-Walczak E und Walczak P. Differentiation of strains from the *Bacillus cereus* group by RFLP-PFGE genomic fingerprinting. *Electrophoresis*, **2012**; 34: 3023-3028.
82. Ouhara K, Komazsuzawa H, Yamaa S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H und Sugai M. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides,  $\beta$ -defensins and LL-37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*, **2005**; 55: 888-896.
83. Ozturk A, Famili P, Vieira AR. The Antimicrobial Peptide DEFB1 Is Associated with Caries. *J Dent Res*, **2010**; 89: 631-636.
84. Page B, Page M und Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol*, **1993**; 3: 473-476.

85. Pereira AL, Franco GC, Cortelli SC, Aquino DR, Costa FO, Raslan SA und Cortelli JR. Influence of Periodontal Status and Periodontopathogens on Levels of Oral Human  $\beta$ -Defensin-2 in Saliva. *J Periodontol*, **2013**; 84: 1445-1453.
86. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, Levy SM und Banas JA. Streptococcus mutans strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host anti-microbial peptides. *Mol Oral Microbiol*, **2011**; 26: 187-199.
87. Pilz W. Zahnkaries. In: Pilz MEW, Plathner CH, Taatz HA: Grundlagen der Kariologie und Endodontie. Barth, Leipzig **1980**.
88. Rateitschak KH, Rateitschak EM und Wolf HF. Parodontologie. Farbatlanten der Zahnmedizin 1. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, **1998**.
89. Reeves R und Stanley HR. The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **1966**; 22: 59-65.
90. Riethe P. Kariesprophylaxe und konservierende Therapie. In: Farbatlanten der Zahnmedizin, Hrsg.: Rateitschak KH und Wolf HF, Thieme, Stuttgart, **1994**; 15.
91. Russell JI, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW und Burchell CK. Caries prevalence and microbiological and salivary caries activity tests in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*, **1990**; 18: 120-125.
92. Sahasrabudhe KS, Kimball JR, Morton TH, Weinberg A und Dale BA. Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva. *J Dent Res*, **2000**; 79: 1669-1674.
93. Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C und Weiger R. Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunologie. 1. Auflage, Quintessenz, Berlin, **2004**.
94. Schröder HE. Pathobiologie oraler Strukturen. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Karger, Basel, **1991**; 82.
95. Schützhold S, Holtfreter B, Hoffmann T, Kocher T, Micheelis W. Trends in dental health of 35- to 44-year-olds in West and East Germany after reunification. *Journal of Public Health Dentistry*, **2013**; 73: 65-73.
96. Sedgley CM und Messer HH. Are endodontically treated teeth more brittle? *J Endod*, **1992**; 18: 332-335.
97. Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM und Williams RAD. Enamel caries. In: Silverstone LM, Johnson NW, Hardie JM und Williams RAD: Dental caries. Macmillan Press, London und Basingstoke, **1981**; 133.

98. Sönju T. Pellicle-formation, composition and possible role. In: Thylstrup A und Fejerskov O: Textbook of cariology. Munksgaard, Copenhagen, **1986**.
99. Soravia E, Martini G und Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS* **1988**; 228: 337-340.
100. Spak CJ, Johnson G und Ekstrand J. Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries Res*, **1994**; 28: 388-393.
101. Steward PS. Theoretical Aspects of Antibiotic Diffusion into Microbial Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**; 40: 2517-2522.
102. Syed SA und Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*, **1972**; 24: 638-644
103. Takahashi N, Iwami Y und Yamada T. Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol*, **1991**; 6: 299–304.
104. Takahashi N, Nyvad B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res*, **2008**; 42: 409-418.
105. Tanaka D, Miyasaki KT und Lehrer RI. Sensitivity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Campylobacter* spp. To the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium. *Oral Microbiol Immunol*, **2000**; 15: 226-231
106. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J und Dale BA. Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Caries Experience in Children. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**; 49: 3883-3888.
107. Tatevossian A und Newbrun E. Diffusion of small ionic species in human saliva, plaque fluid and plaque residue in vitro. *Arch Oral Biol*, **1983**; 28: 109-115.
108. Tenovou J, Lumikari M und Soukka T. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects against cariogenic bacteria and potential clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc*, **1991**; 87: 197-208.
109. Theilade E und Theilade J. Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth. *Scand J Dent Res*, **1985**; 93: 90-95.

110. Tomasinsig L und Zanetti M. The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, **2005**; 6: 23-34.
111. Tukia-Kulmala H und Tenovuo J. Intra- and inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli, and mutans streptococci among 11-to 12-year-oldschoollchildren. *Acta Odontol Scand*, **1993**; 51: 31-37.
112. Turkoglu O, Emingil G, Kütükcüler N und Atilla G. Gingival Crevicular Fluid Levels of Cathelicidin LL-37 and Interleukin-18 in Patients With Chronic Periodontitis. *J Periodontol*, **2009**; 8: 969-976.
113. Wan AK, Seow WK, Walsh LJ und Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of Streptococcus mutans. *Aust Dent J*, **2002**; 47: 21-26.
114. Weinberg A, Krisanaprakornkit S und Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: Review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*, **1998**; 9: 399-414.
115. Whittaker CJ, Klier CM und Kolenbrander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **1996**; 50: 513-552.
116. Wieser A, Schneider L, Jung J und Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, **2012**; 93: 965-974.
117. Wong L und Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Bio.*, **2001**; 46: 477-486.
118. Woo JS, Jeong JY, Hwang YJ, Chae SW, Hwang SJ und Lee HM. Expression of cathelicidin in human salivary glands. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **2003**; 129: 211-214.
119. van der Reijden WA, Vissinkb A, Veermana ECI und Amerongen AVN. Treatment of oral dryness related complaints (xerostomia) in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, **1999**; 58: 465-474.
120. Zanetti M. The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. *Curr Issues Mol Biol*, **1995**; 7: 179-196.
121. Zuhrt R, Reussel G und Vierus H. Fissurenquerschnitt und Kariesdisposition. *Dtsch Stomat*, **1971**; 21: 160-163.
122. Zylber LJ und Jordan HV. Development of a selective medium for detection and enumeration of Actinomyces viscosus and Actinomyces naeslundii in dental plaque. *J Clin Microbiol*, **1982**; 15: 253-259.

## 9                    **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildung 1: Struktur von LL-37 (nach Tomasinsig und Zanetti, 2005)

Abbildung 2 und 3: HNP-3 (nach Hill *et al.*, 1991) und HBD-2 (nach Bauer *et al.*, 2001)

Abbildung 4: Graphische Darstellung des Studienablaufs

Abbildung 5: pH-Teststreifen

Abbildung 6: CRT-Buffer-Kit

Abbildung 7: Entnahme der Plaqueprobe

Abbildung 8: Bebrütete Platten

Abbildung 9 und 10: Reinkulturen von *A. naeslundii*

Abbildung 11: MALDI-TOF-MS

Abbildung 12:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure;  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{CO}_2\text{H}$

Abbildung 13 und 14: MALDI-Target mit aufgetragenen Proben

Abbildung 15 und 16: NanoDrop

Abbildung 17: Elektrophoresekammer

Abbildung 18: Elektrophorese-Auswertung

Abbildung 19 und 20: 48-well-Platte mit Biofilm-Disc

Abbildung 21 und 22: Reaktion des alamarBlue®-Assays

Abbildung 23: alamarBlue®-Platte nach abgeschlossener Reaktion

Abbildung 24: 96-well-Platte mit Bradford-Assay

Abbildung 25 und 26: Reaktionsgleichung der Farbreaktion

Abbildung 27: ELISA-Platte nach abgeschlossener Farbreaktion

Abbildung 28: Altersverteilung der Patienten

Abbildung 29: Zwischenmahlzeiten und zuckerhaltige Getränke

Abbildung 30: Kaffee-/ Teekonsum und Kaugummikauen

Abbildung 31: Zahnputzverhalten

Abbildung 32: Verwendung von Zahnseide

Abbildung 33: Verwendung von fluoridhaltiger Zahnpasta

Abbildung 34: Weitere Fluoridierungsmaßnahmen

Abbildung 35: Frühere Parodontitisbehandlung

Abbildung 36: Vorhandener Zahnersatz

Abbildung 37: Gründe für Zahnverlust

Abbildung 38: PSI-Code

Abbildung 39: Verteilung des Kariesrisikos

Abbildung 40: Anzahl der aktiven kariösen Läsionen

Abbildung 41: Speichelflussrate

Abbildung 42: Pufferkapazität

Abbildung 43: Bakterienreduktion abhängig von Keim, AMP und Konzentration

Abbildung 44: Signifikante Unterschiede der Bakterienreduktion bei *Lactobacillus spp.* für verschiedene AMPs, Post-hoc-LSD-Test ( <sup>a</sup> p = 0,005; <sup>b</sup> p = 0,028)

Abbildung 45: Signifikante Unterschiede der Bakterienreduktion aller Keime abhängig von den AMPs, Post-Hoc-LSD-Test ( <sup>a</sup> p < 0.0001; <sup>b</sup> p < 0.0001; <sup>c</sup> p = 0.006; <sup>d</sup> p = 0.001; <sup>e</sup> p < 0.0001; <sup>f</sup> p = 0.007)

Tabelle 1: Basensequenzen der AP-PCR-Primer

Tabelle 2: Aminosäuresequenzen der AMPs

Tabelle 3: Zusammenfassung der deskriptiven, klinischen Parameter

Tabelle 4: AMP-Konzentrationen im Speichel

Tabelle 5: Risikostratifizierung der Bakterienstämme

Tabelle 6: Risikostratifizierung der einzelnen Patienten hinsichtlich verschiedener Spezies



## 10 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimicrobial peptide / Antimikrobielle Peptide
ANOVA	Analysis of variance
AP-PCR	arbitrarily primed polymerase- chain reaction
CFU	Colony-forming-unit
CHX	Chlorhexidin-Digluconat
DMFT-(Wert)	decayed missing filled teeth- (Wert)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraaceta/ Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays
HBD	Human beta-defensin
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HNP	Human neutrophil peptide
HRP	horse radish peroxidas/ Merrettich-peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
LSD-Test	Least Significant difference- Test
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	phosphate buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Plaque Control Record
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase Kettenreaktion
PSI	Paradontale Screening Index
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
TBC	Tuberkulose
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
WHO	World Health Organization

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung und auf dem Weg dieser Arbeit stets unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Karin Christine Huth, Oberärztin der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung dieses spannenden und herausfordernden Themas und ihrer kompetenten Betreuung.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, dass ich diese Studie an seiner Einrichtung durchführen durfte.

Des Weiteren danke ich Maximilian Kollmuß, der mich stets tatkräftig unterstützte und mir durch seinen Einsatz und seine große Hilfsbereitschaft jederzeit zur Seite stand. Somit wurde es mir möglich, meine Leidenschaft zur Materie zu erlangen und zu vertiefen.

Es ist mir zuletzt eine Herzensangelegenheit, mich bei meiner Familie zu bedanken, die mich grenzenlos unterstützt hat und mir zu jeder Zeit wertvollen Rat geboten hat.

# Anhang 1 (Patientenaufklärung)

Version I vom 01.10.2012

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie –  
Campus Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel



\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig\_\_\_\_\_  
Maximilians\_\_\_\_\_  
Universität\_\_\_\_\_  
München\_\_\_\_\_

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,  
Goethestraße 70, 80336 München

OÄ Priv.-Doz. Dr. K. C. Huth, M. Kollmuß, S. Kist  
Tel.: 089/ 5160-9411

Studientitel:

## **„Untersuchungen zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide auf oralpathogene Keime im Biofilm“**

### **Patienteninformation und Einverständniserklärung**

Liebe Patientin, lieber Patient, liebe Erziehungsberechtigte!

Antimikrobielle Peptide des Speichels haben einen großen Einfluss auf die Bakterienflora der Mundhöhle. Insbesondere die Kontrolle des Wachstums von oralpathogenen Bakterien ist für die Entwicklung und Verhinderung einer Karies- bzw. Parodontiserkrankung von größter Wichtigkeit. Im Rahmen dieser Studie sollen verschiedene aus supra- bzw. subgingivalem Zahnbelag (Plaque, über- bzw. unterhalb des Zahnfleisches) gewonnene Bakterienstämme hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Peptiden getestet werden. Zusätzlich sollen in einer Speichelprobe die Konzentrationen von diesen Peptiden gemessen werden. Das langfristige Ziel ist das genaue Verständnis des Wirkungsmechanismus und Einflusses der antimikrobiellen Peptide auf die Entstehung von Karies bzw. Parodontitis, um die Entwicklung neuartiger Substanzen zur Prävention zu ermöglichen.

Hierfür werden bei Ihnen im Rahmen der Studie zwei Plaqueproben (mit einem sterilen Wattepellet von der Zahnoberfläche bzw. einer sterilen Papierspitze aus einer Zahnfleischtasche) genommen sowie eine Speichelprobe über 3 Minuten gesammelt.

**Die Ergebnisse der zahnärztlichen Untersuchung unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und werden vertraulich behandelt. Eine Weitergabe der gespeicherten erhobenen persönlichen Daten und Befunde erfolgt ausschließlich in verschlüsselter Form, wobei keine personenbezogenen Elemente wie Initialen oder Geburtsdaten erscheinen. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf die folgenden Personen beschränkt: OÄ**

**PD Dr. K.C. Huth (Studienleiterin), M. Kollmuß und S. Kist. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet.**

**Die Verschlüsselung der erhobenen Daten gilt auch für etwaige Veröffentlichungen der Daten der Laborexperimente. Im Falle Ihres Widerrufs der Einwilligung zu diesem Zeitpunkt werden die anonymisierten Daten weiter verwendet.**

Ich wurde vollständig über die Bedeutung und Tragweite der Plaque- und Speichelprobenentnahme aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Es wurde keine Wege-, Unfall-Versicherung abgeschlossen.

Ich weiß, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist und dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die spätere Behandlung durch meinen Arzt auswirken wird.

**Hiermit willige ich in die Teilnahme an der beschriebenen Studie ein.**

**Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden**

München, den .....

Aufklärender Arzt: .....

Patient: .....

Erziehungsberechtigter (bei minderjährigen Patienten): .....

## Anhang 2 (Anamnese- und Befundbogen)

Klinikum der Universität München

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie –  
Campus Innenstadt

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel



\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians \_\_\_\_\_  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie,  
Goethestraße 70, 80336 München

OÄ Priv.-Doz. Dr. K. C. Huth  
M. Kollmuß, S. Kist

Tel.: 089/ 5160-9411

### ***Klinische Studie zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide auf kariespathogene Bakterien im Biofilm***

#### **Dokumentationsbogen**

Codeaufkleber	Patientenaufkleber Name + Geb. Datum Bitte eintragen
---------------	--

Behandler: \_\_\_\_\_

☐ Schein I

☐ Schein II

Assistent: \_\_\_\_\_

Datum der Probenentnahme: \_\_\_\_\_

Folgende Proben/Tests müssen abgenommen werden:

- Plaqueprobe (Wattepellets in Kunststoffgefäß klein)
- Speichelprobe (großes Kunststoffgefäß)
- Pufferkapazität des Speichels (Ergebnis bitte auf dem Befundbogen eintragen!)
- pH-Wert des Speichels (Teststreifen)

## Anamnesebogen

Alter: \_\_\_\_\_

Geschlecht: ☐ weiblich ☐ männlich

Raucher: ☐ ja ☐ nein

Seit wann? \_\_\_\_\_ Stück/Tag? \_\_\_\_\_ Pack years: \_\_\_\_\_

Wie viele kleine Zwischenmalzeiten nehmen Sie pro Tag ein (*Schokoriegel, Bonbons, Kekse, etc.*)?

☐ 0 – 2 ☐ 3 – 5 ☐ >5

Wie oft trinken Sie zuckerhaltige Getränke pro Tag (*Cola, Fruchtsäfte, etc.*)?

☐ 0 – 2 ☐ 3 – 5 ☐ >5

Wie viele Tassen Kaffee trinken Sie pro Tag?

☐ 0 ☐ 1-2 ☐ >2

Wie viele Tassen Tee trinken Sie pro Tag?

☐ 0 ☐ 1-2 ☐ >2

Gibt es etwas was Sie sehr häufig essen bzw. trinken?

\_\_\_\_\_

Wie oft am Tag putzen Sie Ihre Zähne?

☐ < 1x ☐ 1x ☐ 2x ☐ 3x

Wie oft benutzen Sie Hilfsmittel für die Zahnpflege (*Zahnseide, Interdentalbürsten, etc.*)?

☐ nie ☐ 1x / d ☐ > 1x / d

Verwenden Sie fluoridhaltige Zahnpasta?

☐ ja ☐ nein

Welche sonstigen Fluoridierungsmaßnahmen wenden Sie an?

☐ elmex gelee (o. ä.) ☐ fluoridiertes Speisesalz ☐ \_\_\_\_\_

Wie oft am Tag kauen Sie Kaugummi?

☐ 0 ☐ 1-2 ☐ >2

Wurde bei Ihnen einmal eine Parodontitis-Behandlung durchgeführt?

☐ nein ☐ ja, ca. \_\_\_\_\_ (Angabe des Jahres)

Beobachten Sie bei sich öfter Zahnfleischbluten (z. B. beim Zähneputzen)?

☐ ja ☐ nein

Tragen Sie Zahnersatz, wenn ja, seit wann?

☐ nein ☐ festsitzend, seit ca. \_\_\_\_\_ ☐ herausnehmbar, seit ca. \_\_\_\_\_

Haben Sie schon Zähne verloren, wenn ja, wie viele und aus welchen Gründen?

☐ nein      ☐ ja, \_\_\_\_\_ durch Kariesfolgen      ☐ ja, \_\_\_\_\_ durch Parodontitis

## Befundbogen

Bestehen derzeit aktive kariöse Läsion (*white spot, neu aufgetretene Kavitation, etc.*)?

☐ nein      ☐ ja, \_\_\_\_\_ (Anzahl der Läsionen)

Bestehen derzeit inaktive kariöse Läsionen, bei denen kein Restaurationsbedarf besteht?

☐ nein      ☐ ja, \_\_\_\_\_ (Anzahl der Läsionen)

Bestehen derzeit erneuerungsbedürftige, insuffiziente Versorgungen (*Sekundärkaries, Füllungsfraktur, etc.*)?

☐ nein      ☐ ja, \_\_\_\_\_ (Anzahl der Läsionen)

## Plaque-Control-Record (PCR nach O'Leary et al.)

18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38

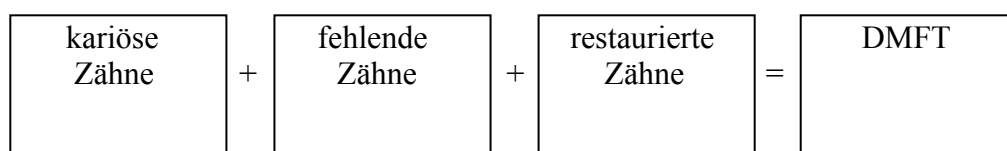
Jeder Zahn wird in 4 Flächen (mesial, distal, oral, buccal) eingeteilt. Wenn eine Fläche plaquebedeckt ist, wird diese im obigen Schema markiert.

PCR-Index: \_\_\_\_\_ % (Anzahl der plaquebedeckten Flächen x 100)/(4 x Anzahl der Zähne)

## Parodontaler Screening Index (PSI)

17-14	13-23	24-27
44-47	44-33	34-37

## DMFT-Index



**Karies-Aktivitäts-Index**

Anzahl nicht restaurierter Läsionen= \_\_\_\_\_

**Pufferkapazität des Speichels (CRT-Test, Ivoclar Vivadent)**

☐ niedrig ☐ mittel ☐ hoch


**Gesamtmenge des Speichels (abgelesen auf dem Sammelgefäß)**

ml

**pH-Wert des Speichels (Teststreifen)**




## Anhang 3 (Votum der Ethikkommission)



**LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**ETHIKKOMMISSION DER LMU MÜNCHEN**



Ethikkommission Telefonkammer 1-00000 München

Frau  
PD Dr. K. C. Huth  
Poliklinik f. Zahnerhaltung  
Goethestr. 70  
80336 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon: +49 (0)89 5160 - 5191  
Telefax: +49 (0)89 5160 - 5192  
Ethikkommission@med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Postanschrift:  
Pellenzofenstr. 8a  
D-80336 München

Hausanschrift:  
Pellenzofenstr. 8  
D-80336 München  
München, 19.02.2013 Hb/ks

<b>Titel:</b>	<b>Untersuchungen zur Wirksamkeit antimikrobieller Peptide auf oralpathogene Keime im Biofilm</b>
<b>Antragsteller:</b>	<b>PD Dr. K. C. Huth</b>
<b>Projekt- Nr.</b>	<b>476-12</b>

Sehr geehrte Frau Kollegin Huth,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 08.02.2013 mit der Erfüllung der Auflagen aus unserem Schreiben vom 27.11.2012 und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (Patienteninformation und Einverständniserklärung für einsichtsfähige Minderjährige).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen. Sie weist darauf hin, dass der Titel dieser Patienteninformation geändert werden muss: die EK hatte eine Informationschrift für „einsichtsfähige“ Minderjährige nachgefordert; Sie bezeichne sie aber für „einwilligungsfähige“ Minderjährige. – Minderjährige sind nicht „einwilligungsfähig“ im rechtlichen Sinne, da die rechtlich wirksame Einwilligung nur von den Sorgberechtigten ausgestellt werden kann).

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger  
 Vorsitzender der Ethikkommission

Nf Mitglieder der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
 Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. L. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. S. Penzger (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. H. Pöschel, Prof. Dr. H. U. Gallwey, Prof. Dr. C. Kunze, Dr. V. Nitsch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. K. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeiler, Dr. C. Zech

## Anhang 4 (Rezepte und Versuchsansätze)

### Aufbewahrung der Plaqueprobe

Wattepellet in 1000 µl eines Probeentnahmemediums (VMG-II, pH = 7,5) nach Syed und Loesche 1972)

0,03g Phenylquecksilberacetat in 800ml H<sub>2</sub>O-bidest lösen

2,4g CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

4,2g KCl

10g NaCl

1g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

100g Natriumglycerophosphat

Auffüllen auf 1000ml mit H<sub>2</sub>O-bidest → Salt Stock Solution II

0,1g mikrobiologischen Agar in 900ml H<sub>2</sub>O-bidest lösen

10g Bacto-Gelatin

0,5g Tryptose

0,5g Thiotone

0,5g Cystein-HCl

0,5ml Thioglykolsäure

10g Aktivkohle (für die Mikrobiologie)

100ml Salt Stock solution II zugeben

### Anzucht von *Strep. mutans*

Mitis-Salivarius-Bacitracin Agar (MSB-Agar nach Wan *et al.*, 2002)

90 g MSB-Agar

1000 µl 1% Kalium-Tellurit-Lösung, Endkonzentration 10 µg/ml

200 g Saccharose

100 µl 1% Kanamycinmonosulfat-Lösung, Endkonzentration 1 µg/ml

600 µl Bacitracin-Stock-Lösung, Endkonzentration 0,2 U/ml

gelöst in 1000 ml Aqua bidest

### Anzucht von *A. naeslundii*

Cadmium Sulfate Fluoride Acridine Trypticase Agar (CFAT-Agar nach Zylber und Jordan, 1982)

15 g mikrobiologischer Agar

30 g Tryptic Soy Broth

5 g D-Glucose

1 ml CFAT-Stock Solution, bestehen aus: 1,3 g Cadmiumsulfat, 0,12 g Acriflavin, 8,0 g Natriumfluorid und 0,025 g Parafuchsin in 100 ml H<sub>2</sub>O-bidest gelöst

50 ml von 5% vol/vol defibriniertes Pferdeblut

250 µl 1% Kalium-Tellurit-Lösung, Endkonzentration 2,5 mg/l

gelöst in 1000 ml Aqua bidest

### Anzucht von *Lactobacillus spp.*

Lactobacillus-Selection-Agar (Rogosa-Agar, modifiziert nach Neumeister *et al.*, 2009)

75 g Rogosa-SL-Agar  
1,32 ml Essigsäure, Endkonzentration 0,132%  
2000 µl Vancomycin, 1% Stocklösung, Endkonzentration 20 µg/ml  
gelöst in 1000 ml Aqua bidest

### Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Columbia Agar mit Schafsblut

5% Schafsblut  
12 g pankreatisch abgebautes Casein  
5 g peptisch abgebautes Tiergewebe, Hefe- und Rindfleischextrakte  
13,5 g Agar

### Stammerhaltung von *Strep. mutans*

Trypticase Soy Yeast extract Broth (TSYB)

30 g Tryptic Soy Broth  
3 g Hefeextrakt auf 1000 ml  
10% vol/vol Glycerin

### Stammerhaltung von *Lactobacillus spp.*

Lactobacilli MRS Broth

55 g Lactobacilli MRS Broth auf 1000 ml  
10% vol/vol Glycerin

### Stammerhaltung von *A. naeslundii*

Brain Heart Infusion (BHI)

37 g Brain Heart Infusion auf 1000 ml  
10% vol/vol Glycerin

### Lyse-Puffer bei der DNA-Extraktion von gram-positiven Bakterien

20 ml einer 100 mM TRIS-HCl Stamm-Lösung, Endkonzentration 20 mM, pH= 8,0  
400 µl einer 0,5 mM Natrium-EDTA-Stammlösung  
12 ml einer 10%-igen Triton X-100 Stammlösung, Endkonzentration 1,2%  
10 ml einer Lysozym-Stammlösung, Endkonzentration 200 mg/ml  
mit 57,6 ml H<sub>2</sub>O–bidest aufgefüllt

#### AP-PCR-Ansatz (Größe: 25 µl)

2,0 µl 10-fach PCR-Puffer (entspricht 2,0 mM in 25µl)  
2,0 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
1,0 µl 360 GC Enhancer  
0,2 µl Taq-Polymerase (entspricht 1 U/Ansatz bei 5 U/µl der Stammlösung)  
0,5 µl dNTP-Mix (Endkonzentration von dATP, dTTP, dGTP und dCTP je 50 µM)

#### Gel der Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

3% Nu-Sieve Agarose 3:1 in 1-fach Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)  
89 mM Tris-Borat  
2 mM EDTA, pH = 8,3  
Ethidiumbromid, Endkonzentration 1 µg/ml

#### Medium zur Biofilmanzucht

##### BMM (nach Wong *et al.* 2001)

2,5 g pig gastric mucin  
10 g Peptone No. 3  
5 g Trypticas  
5 g Hefeextrakt  
2,5 g Kaliumchlorid  
unter Erhitzung in 1000µl H<sub>2</sub>O gelöst  
Autoklavieren bei 121° C für 15 min  
100 µl Haemin-Stammlösung, Endkonzentration 5 µg/ml in Ethanol gelöst  
100 µl Menadione-Stammlösung, Endkonzentration 1 µg/ml in Ethanol gelöst  
1000 µl Harnstoff-Lösung, Endkonzentration 1 µmol/ml in Wasser gelöst  
1000 µl Arginin-Lösung, Endkonzentration 1 µmol/ml in Wasser gelöst

Zugabe von:

10 g Saccharose / 1000 µl für 6 h/d

#### Stopper-Lösung für CHX und AMPs

0,3% Lecithin  
3% Tween 80 Polysorbat  
gelöst in H<sub>2</sub>O-bidest

## **Eidesstattliche Versicherung**

Goeke, Julia Eliette

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Klinische Studie über den Zusammenhang von Kariesindizes und dem Auftreten gegenüber antimikrobiellen Peptiden unterschiedlich empfindlichen kariespathogenen Bakterienstämmen“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Köln,